

地衣芽孢杆菌类细菌素的分离、鉴定及其原核表达

于秀菊, 韩小涛, 李钰钰, 孙铮, 董常生

山西农业大学 动物医学学院, 山西 太谷 030801

于秀菊, 韩小涛, 李钰钰, 等. 地衣芽孢杆菌类细菌素的分离、鉴定及其原核表达. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2453-2462.
Yu XJ, Han XT, Li YY, et al. Isolation, identification and prokaryotic expression of a bacteriocin-like substance from *Bacillus licheniformis*. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2453-2462.

摘要: 目前, 我国饲料中全面禁止添加抗生素, 寻找新型的抗生素替代物成为科学研究的热点之一。为获得新的细菌素, 本研究以大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、藤黄微球菌和单增李斯特氏菌为指示菌, 通过牛津杯扩散法从羊驼粪便中筛选到高产抑菌物质的芽孢杆菌。基于菌落特征、革兰氏染色和 16S rRNA 的鉴定结果, 将分离到的产抑菌物质菌株命名为地衣芽孢杆菌 SXAU06 株。采用硫酸铵沉淀、氯仿抽提、分子截留和 SDS-PAGE 等技术对所产抑菌物质进行分离纯化, 经 LC-MS/MS 和生物信息学分析发现, 抑菌物质为分子量约 14 kDa 的类细菌素, 将其命名为 BLIS_SXAU06。耐受性试验结果显示, BLIS_SXAU06 具有耐高温、耐酸碱和耐蛋白酶 K 的特性。利用大肠杆菌表达系统对 BLIS_SXAU06 进行重组表达, 所获得的重组 BLIS_SXAU06 具有抑制金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、藤黄微球菌和单增李斯特氏菌生长的活性。综上所述, BLIS_SXAU06 具有优良的特性, 可进一步在农业生产、生物医药和食品加工领域开展研究。

关键词: 地衣芽孢杆菌, 类细菌素, 抑菌活性, 热稳定, pH 稳定

Isolation, identification and prokaryotic expression of a bacteriocin-like substance from *Bacillus licheniformis*

Xiuju Yu, Xiaotao Han, Yuyu Li, Zheng Sun, and Changsheng Dong

College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taihu 030801, Shanxi, China

Abstract: The ban on addition of antibiotics in animal feed in China has made the search for new antibiotics substitutes, e.g. bacteriocin, a hot topic in research. The present study successfully isolated an antibacterial substance producing strain of *Bacillus* sp. from alpaca feces by agar diffusion method, using *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* and *Listeria monocytogenes* as indicator bacteria. The isolated strain was named as *B. licheniformis* SXAU06 based on colony morphology, Gram staining and 16S rRNA gene sequence. The

Received: March 4, 2021; **Accepted:** April 30, 2021

Supported by: Youth Foundation of Shanxi Province, China (No. 201801D221301), Innovation Team of Shanxi Agricultural University (No. CXTD201201).

Corresponding author: Changsheng Dong. Tel: +86-354-6289208; E-mail: dongchangsheng@126.com

山西省青年基金 (No. 201801D221301), 山西农业大学创新团队项目 (No. CXTD201201) 资助。

网络出版时间: 2021-05-18

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210517.1749.001.html>

antibacterial substance was isolated and purified through a series of procedures including $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, chloroform extraction, molecular interception and SDS-PAGE analysis. Bioinformatics analysis of the LC-MS/MS data indicated that the antibacterial substance was a bacteriocin-like substance (BLIS) with an approximate molecular weight of 14 kDa, and it was designated as BLIS_SXAU06. BLIS_SXAU06 exhibited high resistance to treatment of proteinase K, high temperature, high acidity and alkalinity. BLIS_SXAU06 was heterologously expressed in *E. coli* and the recombinant BLIS_SXAU06 exhibited effective antibacterial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, and *L. monocytogenes*, showing potential to be investigated further.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, bacteriocin-like, antibacterial activity, thermal stability, pH stability

细菌素是一类通过某些细菌的核糖体合成产生的具有抑制亲缘微生物生长的多肽、蛋白类抗菌物质。通过细菌素数据库 BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab.org>) 和蛋白质结构数据库 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 对已知细菌素的比较, 结果显示, 不同细菌素的氨基酸组成、电荷数、疏水性和极性、空间排列和构象存在很大的差异^[1]。细菌素的多样性特征为其在抗菌领域的应用提供了丰富的选择材料^[2]。近年来, 随着抗生素残留和耐药菌在卫生、食品、养殖等领域的不断出现, 新型抗生素替代品的研究备受关注^[3], 细菌素因其有别于抗生素的抑菌作用机制、不易产生耐药性和无毒无害的特点, 成为最有可能替代抗生素的物质之一^[4]。

芽孢杆菌产生的细菌素是继乳酸菌细菌素之后的又一类重要的细菌素, 与乳酸菌细菌素相比, 芽孢杆菌细菌素抗菌谱更广, 并具有较强的耐高温、耐酸碱等特性^[5-6], 这些优良特性提示芽孢杆菌产生的(类)细菌素具有广泛的应用前景^[7-8]。截至目前, 已分离到的芽孢杆菌细菌素有 80 余种, 类细菌素 20 余种, 分别是由地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 和凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* 等属的菌株产生。研究过程中发现, (类)细菌素是细菌产生的天然成分, 其分子量虽小, 但伴随其合成往往需要

一簇基因的共同表达才可以完成^[9-11], 且与众多物质混合, 存在产量低、分离纯化难度大等问题。利用基因工程技术合成细菌素是一条高效、低成本的生产途径^[12]。据现有文献报道, 鲜有从获取细菌素的基因序列入手, 通过体外表达系统获取细菌素的研究。本文旨在从羊驼粪便中筛选具有高产细菌素的芽孢杆菌, 通过细菌素的分离纯化和质谱分析获得(类)细菌素的氨基酸序列, 利用大肠杆菌表达系统对细菌素进行体外表达并检测其抑菌活性, 同时对该类细菌素的生物学特性进行鉴定, 为细菌素的获取和应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 指示菌与试剂

指示菌: 大肠杆菌 *Escherichia coli* CMCC44102、甲型副伤寒沙门氏菌 *Salmonella paratyphi A* CMCC(B)50001、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC26003、表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* CMCC(B)26069、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* CMCC(B)28001、单增李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes* ATCC19111, 保存于山西农业大学羊驼生物工程实验室。

牛津杯扩散法所用双层培养基: 下层板为 2% 琼脂培养基, 上层板为 15 mL 含 10^7 CFU/mL 指示菌的 0.75% TSA 培养基 (胰蛋白胨 15.0 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 30.0 g, 琼脂 7.5 g, 加蒸馏水至 1 L) 或者 0.75% BHI 培养基 (38.5 g 脑心

浸液肉汤颗粒, 琼脂 7.5 g, 加蒸馏水至 1 L)。氯化钠、氯仿等生化试剂购自中国医药集团有限公司; 硫酸铵、革兰氏染色试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒等购自北京索莱宝科技有限公司; 3 kDa、10 kDa 超滤离心管和 0.22 μm 无菌滤器购自 Millipore 公司。

1.2 产细菌素芽孢杆菌的筛选和鉴定

在山西农业大学羊驼养殖基地, 随机采取 10 头羊驼的粪便, 参照研究报道的方法^[4]进行分离, 按照 0.2 g/头用 PBS 将羊驼粪便制成均匀的悬液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 进行 10 倍梯度稀释, 涂布于 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 观察菌落形态、大小和颜色等特征, 结合革兰氏染色情况, 挑选菌落并进行编号。划线纯化 4 次后, 牛津杯扩散法测定挑选菌株发酵上清液的抑菌活性。

通过抑菌效果的比较, 获得一株抑菌活性最佳的菌株, 对其进行 16S rRNA 菌种鉴定, 步骤如下: 以提取的菌体 DNA 作为模板, 利用通用引物进行 16S rRNA 全长序列的 PCR 扩增。所用的引物序列如表 1 所示。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物大小。将扩增产物送至北京六合华大基因科技有限公司进行 16S rRNA 分子鉴定。运用 NCBI 的 BLAST 进行核苷酸序列的比对, 使用 Cluster Omega 在线分析软件, 构建系统发育树, 分析分离菌株的同源性和菌种归属。

1.3 细菌素的分离纯化

硫酸铵沉淀: 用饱和度为 60% 的硫酸铵对 1 L 无细胞上清液进行盐析, 室温下磁力搅拌器低速搅拌 6 h 后, 10 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 1/40 体积的 PBS 重悬沉淀; 氯仿抽提: 硫酸铵沉淀所获溶液与氯仿按照 1:1 体积比混合, 振荡 15 min

后静置 10 min, 4 500 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 收集中间相, 真空浓缩仪进行干燥, PBS 重悬沉淀物; 分子截留: 利用 3 kDa 和 10 kDa 超滤离心管进行分子截留, 获得 > 10 kDa、3–10 kDa 和 < 3 kDa 的蛋白液; SDS-PAGE 分析: 一个泳道进行考马斯亮蓝染色, 另两个泳道用 0.1% Tween 80 清洗 3 次, 30 min/次, 之后 MilliQ 水清洗 30 min 除去 SDS, 一个泳道的整条胶、另一泳道的分段胶移至 LB 平板, 在其上倾倒含有 10⁷ CFU/mL 金黄色葡萄球菌的 0.75% TSA 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 测定其抑菌效果。分离纯化的每一步后均进行抑菌活性检测。

1.4 细菌素对温度、pH、人工胃液和人工肠液的耐受性测定

将纯化后的细菌素溶液, 分别在 70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 30 min, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压处理 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 6 个月。待处理溶液冷却后采用牛津杯扩散法测定其抑菌活性, 以未处理的类细菌素溶液作为对照。

将纯化后的细菌素溶液分别调 pH 值至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 6 h 后将 pH 值调至 7.0, 检测其抑菌活性, 以 pH 7.0 的类细菌素溶液作为对照。

纯化后的细菌素溶液用 1 mg/mL 的蛋白酶 K、胰蛋白酶、DNase、RNase 和链霉蛋白酶 E, 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h, 测定不同酶处理后的细菌素的抑菌活性, 以未处理的类细菌素溶液作为对照。

参考中华人民共和国兽药典的方法^[13], 配置人工胃液 (Simulated gastric fluid, SGF) (配置 pH 值为 2.0、3.0、4.0 的稀盐酸溶液, 高压灭菌。在无菌条件下, 1 g/100 mL 比例加胃蛋白酶) 和人工肠液 (Simulated intestinal fluid, SIG) (磷酸二氢钾 6.8 g 加入 500 mL 水摇匀后用 NaOH 调 pH 至 6.8, 另加水溶解胰酶 10 g, 将两液混合后定容至 1 000 mL。在制好的溶液中加入猪胆盐, 配置含有 0.1%、0.3%、0.9% 猪胆盐的肠液)。取 10 mL

表 1 16S rRNA 鉴定所用引物

Table 1 Primers used for 16S rRNA identification

Primer name	Sequence (5'-3')
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

的细菌素溶液分别与 90 mL 的不同 pH 的人工胃液或不同浓度胆盐的人工肠液混合, 37 °C 条件下作用 6 h, 采用牛津杯扩散法测定其抑菌活性, 细菌素溶液与 PBS 按照体积比 1 : 9 混合作为对照。

1.5 质谱及生物信息学分析

将具有抑菌活性的 SDS 电泳胶条送至北京六合华大基因科技有限公司, 进行质谱分析。通过 UltiMate3000 (Dionex) 和 Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) LC-MS/MS 质谱仪系统进行蛋白分析。运用 Mascot 软件 (Matrix Science)、NCBI 和 ExPASy-ProtParam tool 进行 UniProt、比对、覆盖率等生物信息学分析, 预测分离菌 SXAU06 所产细菌素的氨基酸序列。根据大肠杆菌密码子偏好性, 优化合成预测抗菌蛋白的基因序列。

1.6 类细菌素的原核表达与纯化

重组质粒的构建: 根据优化后的类细菌素基因序列, 设计构建表达载体的特异性引物, 上、下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点。所设计的引物序如表 2 所示。以优化序列为模板, PCR 扩增基因序列。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测和回收纯化后, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 与同样经过双酶切的 pCold- I 表达质粒进行连接构建重组质粒, 通过测序和酶切鉴定重组质粒的正确性。

原核表达: 将重组质粒转化至 *E. coli* 感受态细胞, 次日挑单菌落, 37 °C 培养 12 h, 按 1% (V/V) 转接入含氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 的 LB 培养基中, 在 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 加入诱导剂 IPTG, 同时设定不加诱导剂的对照组, 15 °C、150 r/min 诱导 12 h。离心收集菌体, 用 PBS 重

悬菌体, 吹打均匀, 超声破碎, 离心收集超声后的上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 检测。

蛋白纯化: 利用 NI-IDA-Sepharose Cl-6B 镍亲和层析柱在 AKTA Pure 进行纯化。条件为: 波长 280 nm, 流速 1 mL/min; 平衡缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 0.15 mmol/L NaCl, pH 8.0; 洗脱缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L 咪唑, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0。收集洗脱峰蛋白溶液至透析袋中, PBS 透析过夜。样品进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。

1.7 重组蛋白的抑菌活性检测

以金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、藤黄微球菌和单增李斯特氏菌为指示菌, 采用牛津杯扩散法对重组蛋白的抑菌活性进行检测。同时设定 Amp 为阳性对照, PBS 为阴性对照。分别在孔中加入 180 μ L 的待测样品, 将抑菌平板放置到培养箱中 37 °C 条件下培养 12 h, 观察并记录抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 分离株发酵上清的抑菌作用

通过菌落形态观察和革兰氏染色镜检初步筛选到 20 株疑似芽孢杆菌 (编号为 SXAU01-20)。分离株发酵上清的抑菌结果显示: 分离株 SXAU06 的无细胞上清液的浓度为 1.568 μ g/ μ L, 对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、藤黄微球菌和单增李斯特氏菌具有较好的抑菌活性 (表 3)。

2.2 分离株的鉴定

分离株 SXAU06 菌落呈灰白色, 菌落边缘不整齐呈不规则, 菌落表面不光滑不透明, 中等大小, 形成“粘液状的花形”菌落 (图 1A); 经革兰氏染色后呈紫色短杆状, 细胞单个或成对存在, 不呈链状排列 (图 1B); 琼脂糖电泳结果显示其 PCR 扩增产物大小为 1 386 bp, 与预计大小一致 (图 1C); 16S rRNA 鉴定结果显示: SXAU06 菌在系统发育进化树上与地衣芽孢杆菌为同一簇, 且与地衣芽孢杆

表 2 表达的类细菌素基因引物序列

Table 2 Primers of BLIS gene to be expressed

Primer name	Sequence (5'-3')
F	TAACGGGATCCAAAAAGATCTTCGTGAGCCT
R	TTGATGTCGACTTAATTACTAAATCCGAAA

表 3 分离株 SXAU06 发酵上清的抑菌活性检测

Table 3 Antibacterial activity assay using the cell-free supernatant of strain SXAU06

Strain	The diameter of the inhibition zones (mm)					
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
SXAU06	0	0	22.38±0.08	21.40±0.15	20.08±0.13	17.51±0.10

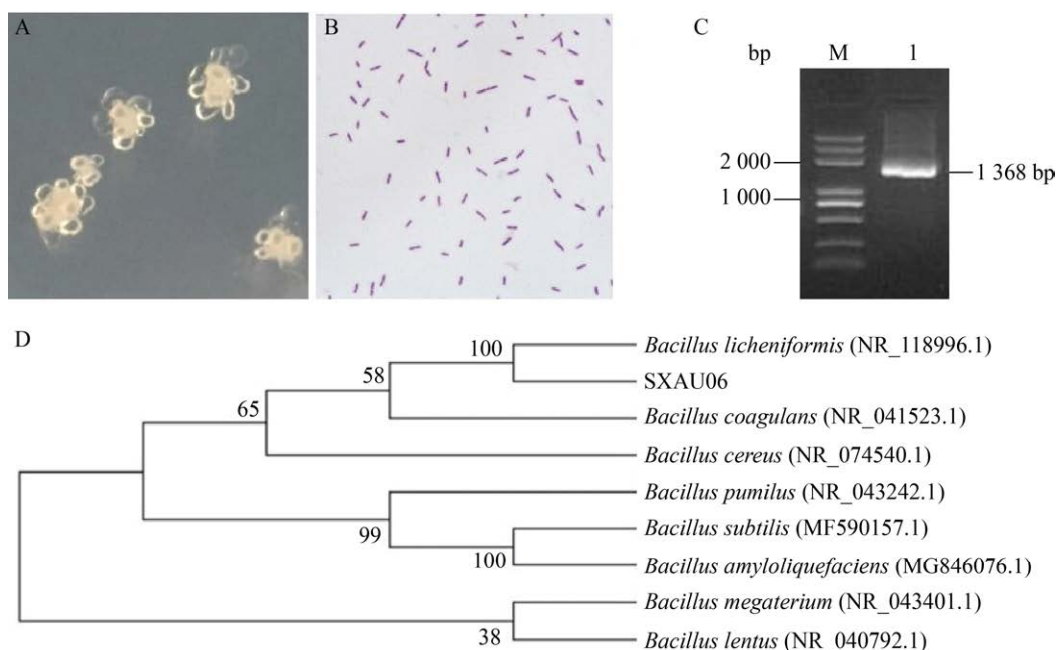


图 1 分离株 SXAU06 的鉴定

Fig. 1 Identification of the isolate SXAU06. (A) Growth morphology. (B) Gram staining morphology. (C) 16S rRNA amplification electrophoresis. (D) Phylogenetic tree.

菌 (NR_118996.1) 相似度高达 99% (图 1D), 因此, 将其命名为地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* SXAU06。

2.3 细菌素的纯化结果

对 *B. licheniformis* SXAU06 产生的细菌素进行分离纯化。1 L 无细胞发酵上清液通过 60% 饱和硫酸铵盐析获得 25 mL 粗提液, 粗提液通过氯仿抽提、真空干燥、PBS 重悬获得与粗提液相同体积的抽提液, 抽提液进行分子截留后, 获得分子量 < 3 kDa、3–10 kDa 之间和 > 10 kDa 的粗蛋白液, 分别测定粗提液、抽提液和粗蛋白液的抑菌活性。抑菌结果如图 2 所示, 与分子量 < 3 kDa、3–10 kDa 粗蛋白液的抑菌活性相比, > 10 kDa 的粗蛋白液具有较强抑菌活性。在 SDS-PAGE 凝

胶 10–15 kDa 的位置有明显的抑菌区域。结果表明, *B. licheniformis* SXAU06 所产抗菌物质是 10–15 kDa 的蛋白质。

2.4 质谱和生物信息学分析

B. licheniformis SXAU06 的 LC-MS/MS 质谱分析得到 85 种蛋白, 肽段覆盖率 > 10% 的蛋白如表 4 所示。通过 NCBI 比对和 ExPASy-ProtParam 分析, 结合 SDS-PAGE 分析和抑菌活性鉴定结果初步判定 *B. licheniformis* SXAU06 所产生的抑菌物质可能是蛋白大小约为 14 kDa 的未知蛋白, 根据该蛋白的氨基酸序列和结构特点, 该蛋白属于类细菌素的一种, 其序列的 NCBI 登录号为: tr|A0A0D7XDH3|A0A0D7XDH3_BACAM。将其命名为 BLIS_SXAU06。

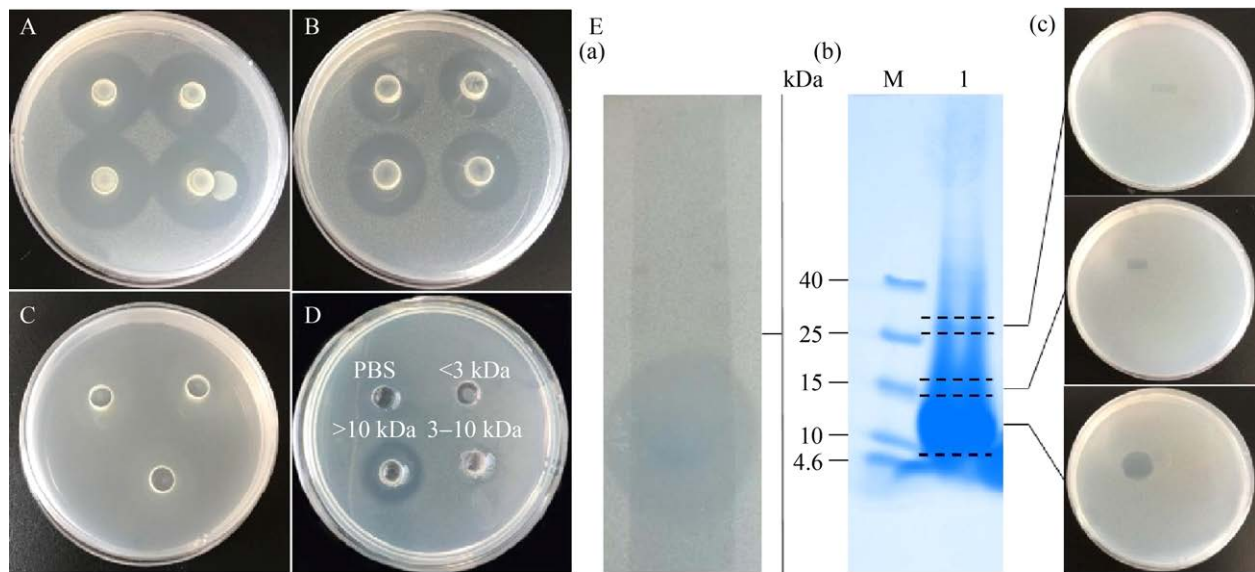


图 2 地衣芽孢杆菌 SXAU06 产生的抑菌物质在分离纯化过程中的抑菌活性检测

Fig. 2 Antibacterial activity assay of the antibacterial substance produced by *B. licheniformis* SXAU06 during the purification process. (A) Antibacterial activity after ammonium sulfate precipitation. (B) Antibacterial activity after chloroform extraction. (C) Negative control. (D) Antibacterial activity after ultrafiltration collection. (E) SDS-PAGE analysis of purified protein (>10 kDa) solution and detection of antibacterial activity on gel. (a) Gel overlaid with *S. aureus* showed a clearing inhibitory zone, indicating antibacterial activity was associated with the band <5 kDa. (b) SDS-PAGE. M: protein ladder; I: sample. (c) Gel overlaid with *S. aureus* showed a clearing inhibitory zone, indicating antibacterial activity was associated with the 10–15 kDa band.

表 4 抑菌蛋白 LC-MS/MS 鉴定结果

Table 4 LC-MS/MS identification of antibacterial substance

Description	Mass	Score	Coverage (%)
Stress response protein YvgO	19.834	1 168	27
Glucuronoxylanase	47.259	1 151	37
Uncharacterized protein	14.047	1 022	34
Beta-glucanase	26.809	884	33
Endo-14-beta-xylanase A	48.669	792	16
Uncharacterized protein	17.032	769	38
Spore cortex-lytic enzyme SleL	49.995	696	35
Uncharacterized protein	60.560	622	24
Arabinoxylan arabinofuranohydrolase	46.880	558	13
2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	14.885	427	12

2.5 类细菌素的温度、pH、人工胃液和人工肠液稳定性

BLIS_SXAU06 具有较好的热稳定性和 pH 稳定性。该细菌素在 100 °C 条件下处理 30 min 后抑菌活性为 100%，121 °C 处理 30 min 后抑菌活性为 50%，4 °C 放置 6 个月，仍保持 100% 的抑菌活性。该细菌素在 pH 2.0–12.0 条件下，抑菌活性稳定，保持原有活性。BLIS_SXAU06 对蛋白酶 K 不敏感，对胰蛋白酶较为敏感，保留抑菌活性的 40%，对链霉菌蛋白酶 E (Pronase E) 最敏感，抑菌活性完全丧失 (表 5)。BLIS_SXAU06 具有较强的耐胆碱和耐胃蛋白酶能力，在 pH 2.0 条件下胃蛋白酶作用 6 h 后抑菌活性为 55%，抑菌活性随着 pH 值的上升而增加。在 0.9% 胆盐浓度条件下作用 6 h 后抑菌活性为 45.6%，抑菌活性随着胆盐浓度的下降而增加 (图 3)。

表 5 温度、pH 和酶对 BLIS_SXAU06 抑菌活性的影响

Table 5 Effects of temperature, pH and enzyme on the antimicrobial activity of BLIS_SXAU06

Treatment	Residual activity (%) [*]	Treatment	Residual activity (%) [*]
Heat		pH	
70 °C, 30 min	100	2.0	100
80 °C, 30 min	100	3.0	100
90 °C, 30 min	100	4.0	100
100 °C, 30 min	100	5.0	100
121 °C, 30 min	50	6.0	100
4 °C, 6 months	100	7.0	100
Enzymes		8.0	100
Proteinase K	100	9.0	100
Trypsin	40	10.0	100
RNase/DNase	100	11.0	100
Pronase E	0	12.0	100

*Residual activity compared with antimicrobial activity before the treatment.

2.6 BLIS_SXAU06 的表达和纯化

SDS-PAGE 分析结果显示, 外源诱导表达的 BLIS_SXAU06 是以可溶性上清蛋白和包涵体蛋白两种形式表达 (图 4A)。重组 BLIS_SXAU06 经过纯化后, SDS-PAGE 分析结果显示, 纯化后的类细菌素蛋白为单一条带 (图 4B)。Western blotting

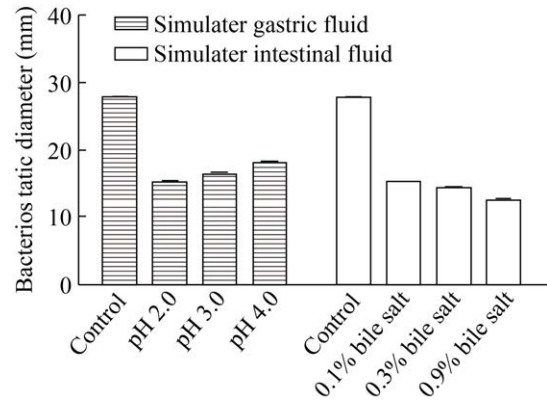


图 3 SGF 和 SIF 对 BLIS_SXAU06 抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of SGF and SIF on the antimicrobial activity of BLIS_SXAU06.

结果表明, 重组 BLIS_SXAU06 能够与鼠抗 His 单克隆抗体特异性结合, 蛋白大小与预计大小相符 (图 4C)。

2.7 重组 BLIS_SXAU06 的抑菌活性检测

重组 BLIS_SXAU06 具有抑制金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、藤黄微球菌和单增李斯特氏菌生长的活性 (图 5A-D), PBS 阴性对照孔周围的细菌生长未受到抑制 (图 5E), Amp 阳性对照孔周围的细菌生长受到了明显的抑制 (图 5F)。结果表明, 由原核表达系统表达的重组 BLIS_SXAU06 具有良好的抑菌活性。

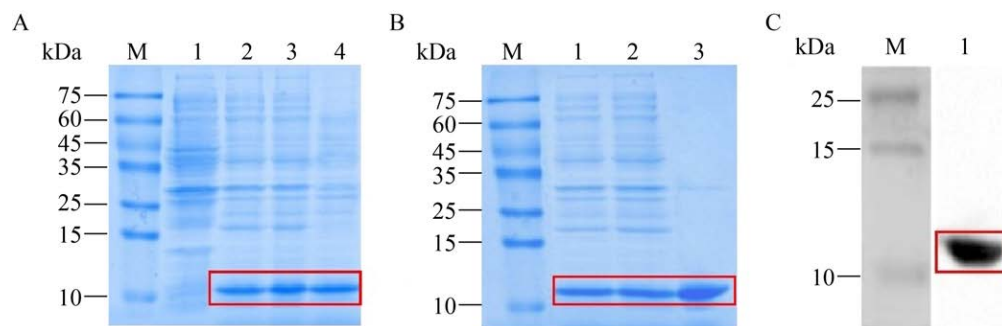


图 4 重组 BLIS_SXAU06 的表达纯化

Fig. 4 Expression and purification of the recombinant BLIS_SXAU06. (A) SDS-PAGE analysis of the recombinant BLIS_SXAU06. M: protein marker; 1: non-induced; 2: induced; 3: supernatant; 4: pellet. (B) SDS-PAGE analysis of the purified recombinant BLIS_SXAU06. M: protein marker; 1: samples after ultrasonic lysis; 2: flow-through; 3: elution. (C) Western blotting analysis of the recombinant BLIS_SXAU06. M: protein marker; 1: purified recombinant BLIS_SXAU06.

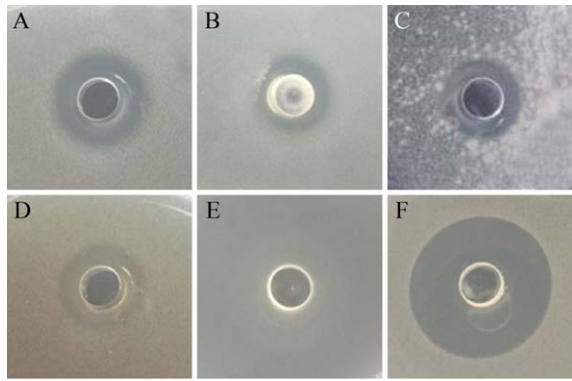


图5 重组 BLIS_SXAU06 的抑菌活性检测

Fig. 5 Antibacterial activity of the recombinant BLIS_SXAU06. (A) *S. aureus*. (B) *S. epidermidis*. (C) *M. luteus*. (D) *L. monocytogenes*. (E) PBS (negative control). (F) Ampicillin (positive control).

3 讨论

芽孢杆菌作为动植物微生态的优势菌之一，不仅种类繁多，来源广泛，具有易培养、抗逆性好、加工损失少等特点^[14-15]，而且孕育着丰富的细菌素资源。分离和筛选具有拮抗功能的芽孢杆菌菌株及其细菌素，并对其作用、生物特性和应用进行研究，不仅可以拓展芽孢杆菌及其细菌素的研究范围，而且可以为细菌素的利用提供更丰富的选择。近年来，有研究者从多种样品中分离到具有不同功能的芽孢杆菌及其(类)细菌素。Xin等^[16]从藏猪肠道中筛选到芽孢杆菌菌株TS，并分离到具有抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长的细菌素TP。Sharma等^[17]从土壤样品中筛选到产细菌素的*B. subtilis* GAS101，其所产细菌素对大肠杆菌和表皮葡萄球菌的生长具有抑制作用，且具有耐高温、耐酸碱的特性。Chauhan等^[18]筛选到有效抑制抗甲氧西林金黄色葡萄球菌生长的芽孢杆菌BLIS TSH58。

本研究从羊驼粪便中筛选到*B. licheniformis* SXAU06，该菌的发酵上清对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、藤黄微球菌和单增李斯特氏菌的生长具有明显的抑制作用。进一步运用硫酸铵沉

淀、氯仿抽提、分子截留和 SDS-PAGE 以及牛津杯扩散法对*B. licheniformis* SXAU06 发酵上清中细菌素的进行分离和鉴定，经质谱和生物信息学分析预测细菌素的氨基酸序列，初步判断，*B. licheniformis* SXAU06 所产抑菌物质可能为分子量约 14 kDa 的蛋白。据文献报道，芽孢杆菌细菌素分为以羊毛硫菌素或环状为特征的 I 类细菌素、以 0.77–10.00 kDa 的小分子线性肽为特征的 II 类细菌素和以大于 30 kDa 分子量蛋白为特征的 III 类细菌素。而其他许多中等大小的抗菌多肽 (10–30 kDa) 和其他由杆菌产生的大分子抗菌蛋白，由于在遗传、分子或氨基酸结构等方面缺乏数据，无法按照分类法进行分类，被统称为 BLIS^[19]。根据芽孢杆菌细菌素分类法和数据库的比对、分析，本研究分离到的抗菌蛋白属于芽孢杆菌 BLIS 的一种。

细菌素应用在医药、农业和食品加工领域中，由于热加工是加工过程中最常用的方法，首先要考虑其热稳定性。Lim 等研究表明，解淀粉芽孢杆菌 RX7 所产细菌素 100 °C 处理 30 min，活性保留 80%，具有良好的热稳定性^[20]。本文分离到的 BLIS_SXAU06 可耐受 121 °C 处理 30 min，具有耐高温特性。乳酸链球菌素 (Nisin) 在酸性环境下有很强的活性，但在中性和碱性环境时，活性丧失，这个特征限制了其应用^[21-23]。芽孢杆菌细菌素在耐酸碱方面表现突出，Ayed 等^[24]从解淀粉芽孢杆菌 An6 发酵产物中分离到 BLIS 在 pH 4.0–10.0 条件下仍具有抑菌活性。Minnaard 等^[25]从蜡样芽孢杆菌分离到的 BLIS m6c 和 BLIS m387，在 70 °C 处理 30 min 活性稳定，在 pH 3.0–7.0 范围内活性稳定。*B. licheniformis* SXAU06 所产的 BLIS_SXAU06 在 pH 2.0–12.0 条件下抑菌活性稳定。不同细菌素对蛋白酶的敏感性不同。地衣素 50.2 可被链霉菌蛋白酶 E 和蛋白酶 K 完全失活，可被胰蛋白酶部分失活^[26]。*B. licheniformis* SXAU06 所产 BLIS_SXAU06 可被

链霉菌蛋白酶 E 完全失活, 可被胰蛋白酶和胃蛋白酶部分失活, 而对蛋白酶 K 不敏感, 这些优良特性使得 BLIS_SXAU06 在饲料加工、药物治疗等方面具有潜在的应用前景。

根据 *B. licheniformis* SXAU06 发酵上清对革兰氏阴性菌基本没有作用的特点, 选择大肠杆菌表达系统作为 BLIS_SXAU06 的表达体系。低温诱导能改变折叠动力学, 从而有效地提高可溶性蛋白的比例, 减少中间折叠体的聚集, 从而降低包涵体的表达比例^[27-29], 因此, 为提高重组 BLIS_SXAU06 的表达量和分泌表达蛋白的比例, 本研究按照大肠杆菌的密码子偏好性对预测蛋白的基因序列进行了密码子优化^[30], 并以 pCold- I 作为表达质粒, 进行低温低速诱导, 最终获得了良好的表达效果。

综上所述, 本研究从羊驼粪便中筛选到产类细菌素的 *B. licheniformis* SXAU06, 所产类细菌素不仅表现良好的抑菌活性、热稳定性、酸碱稳定性, 且对人工胃液和人工肠液具有一定的耐受性。通过大肠杆菌表达系统获得了具有抑菌活性的重组 BLIS_SXAU06。后续可对 *B. licheniformis* SXAU06 和 BLIS_SXAU06 的生物学功能进行研究, 开发其在农业生产、生物医药和食品加工领域的应用。

REFERENCES

- [1] Towle KM, Vederas JC. Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *Medchemcomm*, 2017, 8(2): 276-285.
- [2] 张军, 王祺, 汤伟, 等. 细菌素对产生菌获得生存优势及其诱导合成条件的研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 923-932.
Zhang J, Wang Q, Tang W, et al. Bacteriocinogeny, the way to acquire survival advantages through biosynthetic regulation: a review. *Microbiol China*, 2020, 47(3): 923-932 (in Chinese).
- [3] De Mol ML, Snoeck N, De Maeseneire SL, et al. Hidden antibiotics: Where to uncover? *Biotechnol Adv*, 2018, 36(8): 2201-2218.
- [4] Lozo J, Mirkovic N, O'Connor PM, et al. Lactolisterin BU, a novel class II broad-spectrum bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* BGBU1-4. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(21): e01519-17.
- [5] Mehdi Y, Létourneau-Montminy MP, Gaucher ML, et al. Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. *Anim Nutr*, 2018, 4(2): 170-178.
- [6] Özel B, Şimşek Ö, Akçelik M, et al. Innovative approaches to nisin production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(15): 6299-6307.
- [7] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(2): 95-105.
- [8] 王瑞, 蔡文涛, 王喜亮, 等. 畜禽中药-益生菌复合微生态制剂的研究进展. *生物工程学报*, 2019, 35(6): 972-987.
Wang R, Cai WT, Wang XL, et al. Progress in Chinese medicine-probiotics compound microecological preparations for livestock and poultry. *Chin J Biotech*, 2019, 35(6): 972-987 (in Chinese).
- [9] Hertzog BB, Kaufman Y, Biswas D, et al. A sub-population of group A *Streptococcus* elicits a population-wide production of bacteriocins to establish dominance in the host. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(3): 312-323.e6.
- [10] Wang Y, Shang N, Qin Y, et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class II a bacteriocin. *J Biotechnol*, 2018, 266: 84-88.
- [11] Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, et al. Expression of genes involved in bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(7): e02707-17.
- [12] 吴怡然, 古小彬, 谢跃, 等. 大熊猫西氏贝蛔虫 BsABF 基因的原核表达及重组蛋白抗菌活性初步分析. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(1): 151-158.
Wu YR, Gu XB, Xie Y, et al. Prokaryotic expression and primary evaluation of antibacterial activity of antibacterial factor in *Baylisascaris schroederi*. *Chin J Animal Vet Sci*, 2019, 50(1): 151-158 (in Chinese).
- [13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S].

- 2015年版一部,北京:中国农业出版社.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Volume I 2015 edition, Beijing: China Agriculture Press.
- [14] Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *J Nat Prod*, 2019, 82(7): 2038-2053.
- [15] Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(3): 410-416.
- [16] Xin H, Ji S, Peng J, et al. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from a native swine intestinal tract-derived bacterium. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(4): 427-436.
- [17] Sharma G, Dang S, Gupta S, et al. Antibacterial activity, cytotoxicity, and the mechanism of action of bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. *Med Princ Pract*, 2018, 27(2): 186-192.
- [18] Chauhan AK, Maheshwari DK, Bajpai VK. Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin-producer *Bacillus* strain inhibiting methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biol Hung*, 2017, 68(2): 208-219.
- [19] Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 35(1): 201-232.
- [20] Lim KB, Balolong MP, Kim SH, et al. Isolation and characterization of a broad spectrum bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* RX7. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8521476.
- [21] Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, et al. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 69(2): 193-202.
- [22] Leroy F, de Vuyst L. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 974-981.
- [23] Penna TCV, Moraes DA. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 98-100: 775-789.
- [24] Ayed HB, Maalej H, Hmidet N, et al. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *J Glob Antimicrob Resist*, 2015, 3(4): 255-261.
- [25] Minnaard J, Alippi AM. Partial characterization of bacteriocin-like compounds from two strains of *Bacillus cereus* with biological activity against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease. *Lett Appl Microbiol*, 2016, 63(6): 442-449.
- [26] Zou J, Jiang H, Cheng H, et al. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 781-789.
- [27] 徐雪姣, 查向东, 车媛媛, 等. 美洲拟鲈抗菌肽 Pleurocidin 在大肠杆菌中的高效分泌表达及优化. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 365-374.
Xu XJ, Zha XD, Che YY, et al. Expression of Pleurocidin from winter flounder in *Escherichia coli* and optimization of culture conditions. *Chin J Biotech*, 2016, 32(3): 365-374 (in Chinese).
- [28] Humer D, Spadiut O. Wanted: more monitoring and control during inclusion body processing. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(11): 158.
- [29] Wingfield PT, Palmer I, Liang SM. Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2001, Chapter 6: Unit6.5.
- [30] 陈荫楠, 刘震, 石贤爱, 等. 密码子优化提高多粘类芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶异源表达量. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(4): 414-422.
Chen YN, Liu Z, Shi XA, et al. Improved heterogenous expression of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase gene by *Codon* optimization. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2017, 33(4): 414-422 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)