

一株拮抗芽孢杆菌的分离鉴定及其 β -1,4-葡聚糖酶基因的克隆

吴慧玲, 刘伟成, 卢彩鸽, 董丹, 张殿鹏, 张涛涛

北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097

摘要 植物真菌病害是影响农业生产的主要因素之一, 连作栽培导致病害逐年加重, 为获得能够抑制病原真菌的生防菌以解决真菌病害防治难题, 通过平板对峙实验及分子鉴定、抑菌活性物质分析、葡聚糖酶基因克隆及分析, 获得一株对多种植物病原真菌具有显著抑制作用的芽孢杆菌, 菌株编号为 L103。16S rDNA 及看家基因序列分析表明, 该菌株为巨大芽孢杆菌, 羧甲基纤维素钠平板筛选及刚果红染色实验发现该菌具有很强的产纤维素酶(CMC 酶)的能力, 根据 GenBank 中巨大芽孢杆菌内切葡聚糖酶基因(HM130670.1)序列设计引物, 将扩增得到的 1482bp 大小的片段克隆到载体 pMD18-T 上, 测序并通过 GenBank 数据库 BLAST 分析显示该序列与一株 *Bacillus* sp. HB102 的内切 β -1,4-葡聚糖酶基因序列一致性达到 95%, 而与 *Bacillus subtilis* 的 β -1,4-内切葡聚糖酶基因一致性为 85%, 进一步分析该菌株产生的抗病活性物质并对其进行改良将为该菌在今后的真菌病害防治应用中提供理论基础。

关键词 巨大芽孢杆菌; 16S rDNA; 内切 β -1,4-葡聚糖酶

中图分类号 Q939.92

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.27.001

Isolation and Identification of an Antagonistic *Bacillus* Strain and Its β -1,4-Glucanase Gene Cloning

WU Huiling, LIU Weicheng, LU Caige, DONG Dan, ZHANG Dianpeng, ZHANG Taotao

Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract Plant fungal diseases are the main factor that affects agricultural production. In order to inhibit fungus diseases, the flat confrontation experiment and the molecular detection were employed for the isolation of biocontrol bacteria. *Bacillus* L103 was isolated from a vegetable field in suburb of Beijing. The antimicrobial spectrum suggests that this strain shows a high level of inhibitory activity against the tested plant pathogenic fungi. The analysis of 16S rDNA and housekeeping gene sequence shows that it is a kind of *Bacillus megaterium*. It could produce β -1,4-glucanase, that was detected on CMC-Na plates and congo red staining. We amplified the endo- β -1,4-glucanase gene and sequenced it according to GenBank No. HM130670.1. Its full length was found to be 1482bp and its amino acid number is about 494. Its endo- β -1,4-glucanase gene sequence has 92% homology with that of the endo- β -1,4-glucanase gene of *Bacillus* sp. HB102, and 85% homology with that of *Bacillus subtilis*.

Keywords *Bacillus megaterium*; 16S rDNA; β -1,4-glucanase

0 引言

巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)作为重要的植物内生菌的主要种群,能够产生多种有益活性物质,对植物具有

防病和促生作用,被广泛地应用于农业生产;同时由于其具有比较成功的异源蛋白原核分泌系统,目前在科学研究和工业应用上越来越受到重视^[1-2]。

收稿日期: 2012-06-28;修回日期:2012-08-03

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6101001);北京市农林科学院科技创新专项(KJCX201101001);公益性行业(农业)科研专项(200903049-07)

作者简介: 吴慧玲,助理研究员,研究方向为微生物代谢产物的研制,电子信箱:wuhuilong925@126.com;刘伟成(通信作者),研究员,研究方向为病害生物防治,电子信箱:liuwc@126.com

葡聚糖酶是将葡聚糖降解为葡萄糖的一类水解酶。根据葡聚糖酶作用于糖苷键位点的不同,可分为 β -1,2-葡聚糖酶、 β -1,3-葡聚糖酶、 β -1,4-葡聚糖酶、 β -1,6-葡聚糖酶。根据葡聚糖酶切点位置的不同,又可分为内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶^[3-4]。葡聚糖酶可作用于真菌细胞壁,引起病原菌细胞壁降解,从而抑制病原菌生长,达到防病目的,在真菌病害的生物防治中起着重要的作用。

目前,研究人员已从多种芽孢杆菌中克隆得到内切葡聚糖酶编码基因,也有人尝试将从枯草芽孢杆菌中克隆得到的内切葡聚糖酶基因转入高效表达宿主巨大芽孢杆菌中进行表达,从而获得高效葡聚糖酶合成工程菌^[5]。本实验室筛选得到一株具有拮抗作用的芽孢杆菌,能够显著抑制生产上发生的严重真菌病害,如甘蓝枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)等病原菌。通过16S rDNA及看家基因序列分析鉴定为巨大芽孢杆菌,进一步深入研究发现该芽孢杆菌具有产纤维素酶的特性,并克隆得到内切葡聚糖酶基因,进而对其基因序列进行了比对分析。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

拮抗菌:芽孢杆菌 L103 分离自北京郊区菜地。

病原菌:甘蓝枯萎病菌,西瓜枯萎病菌,小麦纹枯病菌,小麦赤霉病菌系本实验保存。

1.2 培养基

芽孢杆菌生长培养基,参照美国 ATCC 菌种库编号 CM0002 培养基:蛋白胨 5g、牛肉膏 3g、氯化钠 5g、琼脂 15g、蒸馏水 1000mL,调 pH 值 7.0。

抑菌活性检测培养基为 PDA 培养基:去皮新鲜马铃薯 200g、葡萄糖 20g、琼脂 17g、蒸馏水 1000mL^[6]。

产纤维素酶筛选培养基:CMC-Na 20g、Na₂HPO₄ 2.5g、KH₂PO₄ 2.5g、蛋白胨 2.5g、酵母膏 0.5g、蒸馏水 1000mL^[7]。

LB 培养基:蛋白胨 10g、酵母粉 5g、氯化钠 10g、蒸馏水 1000mL,调 pH 值 7.0^[8]。

以上几种培养基均经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min 后,4℃ 冷藏备用。

1.3 主要试剂

PCR 试剂、氨苄青霉素(Amp)、DNA Marker、DNA 凝胶回收试剂盒等均购自天根生化科技有限公司;限制性内切酶、T4DNA 连接酶、pMD18-T 载体等均购自 TaKaRa 生物技术公司。

1.4 对真菌抑制活性的检测

采用平板对峙法测定抑菌活性^[9]。首先将 PDA 琼脂平板上活化好的病原真菌用直径为 7mm 打孔器制菌饼置于 9cm PDA 琼脂平板一侧,培养 2d,将活化好的芽孢杆菌 L103 接种到对面约 3cm 处,设不接种 L103 的处理为对照,28℃ 培养,至对照铺满整个平板,观察记录抑菌情况。

1.5 β -1,4-葡聚糖酶活性测定

将芽孢杆菌 L103 点种到纤维素酶筛选培养基上,37℃ 培养 2d,用 4g/L 的刚果红染色 5min,再用 0.9%NaCl 冲洗,测量水解圈的直径^[7]。

1.6 芽孢杆菌基因组 DNA 的提取与纯化

芽孢杆菌 L103 基因组 DNA 的提取与纯化参照《精编分子生物学实验指南》^[10],并做一定的修改。

1.7 细菌 16S rDNA 及芽孢杆菌 *spoOA* 基因的扩增

16S rDNA 的 PCR 扩增使用通用引物 27F (5'-A-GAGTTTGATCTGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CGGTGTGTA-CAAGCCCC-3')。反应在 95℃ 预变性 5min,30 个循环(94℃ 40s,55℃ 30s,72℃ 1min),72℃ 延伸 10min。将扩增片段克隆到质粒 pMD18-T 的 T 载体上。通用引物测序,得到的 16S rDNA 基因序列用 BLAST 搜索程序从 GenBank 中进行同源性分析。

spoOA 基因为促进休眠芽胞体形成的转录操纵蛋白基因,可作为巨大芽孢杆菌分类鉴定的特异基因^[11]。根据巨大芽孢杆菌 *spoOA* 基因特异引物序列进行以 L103 基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增,P1 (5'-TGATGATAATCGGGAACT-3') 和 P2 (5'-TGAATGATGCTCGTAATG-3')。将扩增得到的 443bp 大小的片段克隆到质粒 pMD18-T 载体上,通用引物测序,得到的基因序列用 BLAST 搜索程序从 GenBank 中进行同源性分析。

1.8 β -1,4-内切葡聚糖酶编码基因的 PCR 扩增

根据魏艳丽等^[9]报道的 β -1,4 内切葡聚糖酶基因 ORF 的 PCR 引物:P3 (5'-ATGAAACGGTCAATCTCTA-3') 和 P4 (5'-CTAATTTGGTTCTGTCCCA-3'),进行 PCR 扩增。将扩增得到的 1482bp 大小的片段克隆到质粒 pMD18-T 载体上。通用引物测序,得到的基因序列用 BLAST 搜索程序从 GenBank 中进行同源性分析。

1.9 β -1,4-内切葡聚糖酶编码基因序列测定和分析

琼脂糖凝胶电泳回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5a 感受态细胞,采用蓝白斑筛选法筛选转化子,摇菌培养后提质粒酶切鉴定,选取阳性转化子送北京中美太和生物技术有限公司进行测序。测序结果采用 DNAMAN 软件分析,将所得 DNA 序列及推导氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的抑菌活性

对峙实验中,在对照病原菌铺满整个平板时,L103 菌株对 4 种供试病原菌均有一定的抑制作用(图 1),其中对甘蓝枯萎病菌及小麦赤霉病菌具有显著的抑制效果。从该菌株的抑菌谱来看,菌株 L103 是一株非常具有潜力的拮抗菌。

2.2 芽孢杆菌 L103 16S rDNA 扩增结果

以细菌 DNA 为模板,进行 PCR 扩增 16S rDNA,结果如图 2 所示,其中 PCR 产物上样量为 4 μ L,在 1.6kb 处有一条特

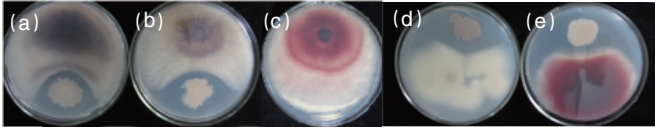


图 1 L103 对 4 种病原真菌的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of L103 against 4 pathogenic fungi

注: (a), 小麦纹枯病菌; (b), 西瓜枯萎病菌; (c), 对照; (d), 甘蓝枯萎病菌; (e), 小麦赤霉病菌。

Notes: (a), *Rhizoctonia cerealis*; (b), *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*; (c), CK; (d), *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*; (e), *Fusarium graminearum*.

异性条带, 与目的条带大小一致。通过 NCBI 数据库 BLAST 分析显示, 该菌株的 16S rDNA 序列与 *Bacillus megaterium* 16S rDNA 序列同源性达 99%, 初步确定为巨大芽孢杆菌。

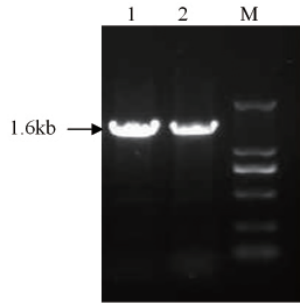


图 2 L103 16S rDNA 扩增结果

Fig. 2 Amplification of 16S rDNA in L103

注: M 为 DNA Marker; 1, 2 为 16S rDNA 基因。

Notes: M, DNA Marker; 1 and 2, 16S rDNA.

2.3 芽孢杆菌 *spoOA* 基因扩增结果

spoOA 基因扩增结果如图 3 所示, 在 443bp 处有一条特异性条带, 与目的条带大小一致。通过 NCBI 数据库 BLAST 分析显示, 该菌株的 *spoOA* 基因保守序列与 *Bacillus megaterium* (CP001982.1) *spoOA* 基因序列同源性达 99%, 结合 16S rDNA 鉴定结果, 确定该菌株为巨大芽孢杆菌。

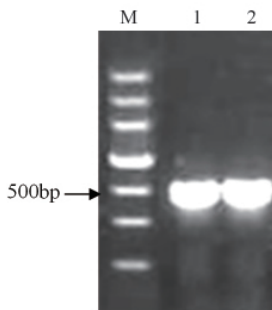


图 3 L103 *spoOA* 基因扩增结果

Fig. 3 Amplification of *spoOA* in L103

注: M 为 DNA Marker; 1, 2 为 *spoOA* 基因。

Notes: M, DNA Marker; 1 and 2, *spoOA*.

2.4 芽孢杆菌 L103 葡聚糖酶活性测定

刚果红染色法对该菌株产纤维素能力的测定结果表明,

在纤维素酶筛选平板上, 菌落周围出现明显的透明圈, 且透明圈大而清晰, 培养 2d 直径可达 2.5cm (图 4), 只有在产纤维素酶的菌落周围才会形成透明圈, 这种透明圈越大, 表明酶活力越高。实验结果表明, 该菌株分泌酶的能力较强, 有进一步研究开发的价值。

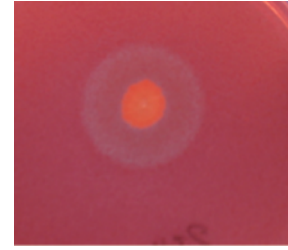


图 4 L103 产葡聚糖酶活性的检测

Fig. 4 Glucanase analysis of L103

2.5 L103 葡聚糖酶合成基因的克隆及其序列分析

β -1,4-内切葡聚糖酶编码基因 PCR 扩增结果如图 5 所示, 得到 1482bp 大小的序列。将该片段克隆到 pMD18-T 载体, 经酶切验证得到了 1.5kb 左右的目标片段和约 2.7kb 的载体片段 (图 6)。说明目的基因成功插入载体中, 用通用引物进

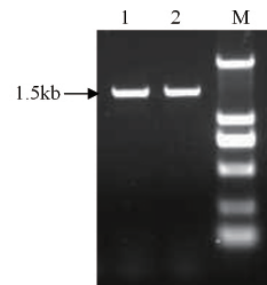


图 5 β -1,4-内切葡聚糖酶基因的 PCR 扩增

Fig. 5 Gel electrophoresis analysis of PCR amplification product of β -1,4-glucanase gene

注: M 为 DNA Marker; 1, 2 为 β -1,4-葡聚糖酶基因。

Notes: M, DNA Marker; 1 and 2, β -1,4-glucanase gene.

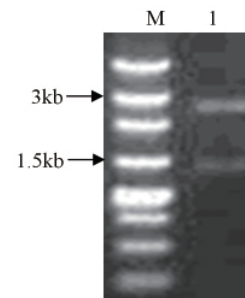


图 6 阳性克隆双酶切电泳图

Fig. 6 Restriction enzyme cutting of positive cloning plasmid

注: M 为 DNA Marker; 1 为双酶切克隆质粒。

Notes: M, DNA Marker; 1, double enzyme cloning plasmid.

行测序。通过 NCBI 数据库 BLAST 分析显示,该菌株的 β -1,4-内切葡聚糖酶编码基因序列与 *Bacillus* sp. HB102 β -1,4-内切 glucanase 同源性达到 95%,与 *Bacillus subtilis* β -1,4-内切葡聚糖酶基因同源性为 85%。

3 讨论

准确快速鉴定微生物种类是开发有价值的微生物产品的必要前提,传统的鉴定方法存在费时费力及准确度不高的问题,分子鉴定方法近年来成为微生物种类鉴定的有效途径。16S rDNA 基因序列分析是细菌分类鉴定的重要手段,目前已被广泛应用于细菌分类学和系统学研究,本文通过 16S rDNA 基因序列分析结合特异性基因 *spoOA* PCR 快速鉴定得到一株能够抑制病原真菌的巨大芽孢杆菌。

构成真菌细胞壁的成分主要是几丁质和葡聚糖,葡聚糖酶和几丁质酶同时作用于真菌细胞壁,可以完全消解病原菌细胞壁,抑制病原菌生长,达到防病目的,在真菌病害的生物防治中受到重视^[12-13]。由于巨大芽孢杆菌无细胞外膜,胞外蛋白种类少,同时具有稳定高效的蛋白质分泌系统,使得蛋白的后提取极其简单方便,因此,近年来备受关注,有望被广泛应用于工业化发酵生产中^[14-15]。因此,目前有很多学者尝试将几丁质酶基因、葡聚糖酶基因等转入到巨大芽孢杆菌中进行高效表达的研究^[13],巨大芽孢杆菌中葡聚糖酶基因的克隆也只有很少的研究报道。本文筛选得到的巨大芽孢杆菌具有很好的抑制病原真菌的活性,同时具有高效合成纤维素酶的能力,在植物真菌病害的防治中具有很好的应用潜能,对其进行进一步的几丁质酶基因的转入以及不同来源葡聚糖酶基因杂合工程菌的构建,可大幅度提高其抑菌活力,从而获得一株多功能植物病害生防菌株。

4 结论

本文通过平板对峙实验筛选得到一株具有抑制病原真菌生长的芽孢杆菌 L103,进一步通过分子鉴定及抑菌活性物质分析,得到如下结论。

(1) 16S rDNA 序列及看家基因 *spoOA* 克隆及序列分析,鉴定该菌株为巨大芽孢杆菌。

(2) 利用几丁质筛选平板培养,没有呈现透明圈,表明该菌株不具有合成几丁质酶的能力;通过羧甲基纤维素钠筛选平板及刚果红染色实验表明该菌具有合成纤维素酶的能力,且活性较强。

(3) 通过 PCR 扩增得到了巨大芽孢杆菌 β -1,4-内切葡聚糖酶基因,基因序列分析表明,该基因读码框为 1482bp,编码 494 个氨基酸。

(4) GenBank 数据库 BLAST 分析显示该菌株的 β -1,4-内切葡聚糖酶基因与一株 *Bacillus* sp. HB102 的内切 β -1,4-葡聚糖酶基因序列一致性达到 95%,而与 *Bacillus subtilis* 的 β -1,4-内切葡聚糖酶基因一致性为 85%。

参考文献 (References)

- [1] Malten M, Biedendieck R, Gsmer M, et al. A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(2): 1677-679.
- [2] Stamman S, Mailer B K, Komeli C, et al. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(12): 4037-4046.
- [3] 魏艳丽,周红姿,扈进冬,等. 巨大芽孢杆菌 AP25 内切葡聚糖酶基因的克隆及序列测定[J]. 山东科学, 2009, 22(5): 22-26. Wei Yanli, Zhou Hongzi, Hu Jindong, et al. *Shandong Sciences*, 2009, 22(5): 22-26.
- [4] Martin D F, Priest F G, Todd C, et al. Distribution of β -glucanase within the genus *Bacillus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(4): 11442-14461.
- [5] Hong T Y, Meng M. Biochemical characterization and antifungal activity of all endo-1, 3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from Garden Soil [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2003, 61(5-6): 472-478.
- [6] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. Zhou Deqing. *Microbiology lab manual*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.
- [7] 周红霞,江海涛,张红琳,等. 纤维素分解菌的分离筛选和产酶条件优化[J]. 南京晓庄学院学报, 2010, 6(6): 37-42. Zhou Hongxia, Jiang Haitao, Zhang Honglin, et al. *Journal of Nanjing Xiaozhuang College*, 2010, 6(6): 37-42.
- [8] 孙军涛,王洪新,吕文平,等. β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因的克隆与序列分析[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(4): 618-623. Sun Juntao, Wang Hongxin, Lv Wenping, et al. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(4): 618-623.
- [9] 潘争艳,刘伟成,裘季燕,等. 放线菌 III-61 和 A-21 对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 92-97. Pan Zhengyan, Liu Weicheng, Qiu Jiyan, et al. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2005, 20(4): 92-97.
- [10] F·M·奥斯伯, R·布伦特, R·E·金斯顿,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. Ausbel F M A, Blunt R, Kingston R E, et al. *Short protocols in molecular biology*[M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [11] 曹凤明. 芽孢杆菌 PCR 鉴定方法的建立和应用 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007. Cao Fengming. *Establishment of PCR identification methods in Bacillus* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007.
- [12] Pitson A M, Seviour R J, Mc Dougall B M. Noncellulolytic fungal β -glucanase: Their physiology and regulation [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15(3): 178-192.
- [13] 朱辉,丁延芹,田方,等. 枯草芽孢杆菌 SC2-4-1 葡聚糖酶基因 *gluB* 的克隆及序列分析[J]. 生物技术通报, 2008(3): 119-123. Zhu Hui, Ding Yanqin, Tian Fang, et al. *Biotechnology Bulletin*, 2008(3): 119-123.
- [14] 陈惠,胥兵,廖俊华,等. 内切葡聚糖酶基因在巨大芽孢杆菌中的表达及其酶学性质研究[J]. 遗传, 2008, 30(5): 649-654. Chen Hui, Xu Bing, Liao Junhua, et al. *Hereditas*, 2008, 30(5): 649-654.
- [15] 郭德军,李岩松,王欣,等. 巨大芽孢杆菌表达系统的特点及其研究进展[J]. 生物技术, 2010, 20(6): 92-95. Guo Dejun, Li Yansong, Wang Xin, et al. *Biotechnology*, 2010, 20(6): 92-95.

(责任编辑 吴晓丽)