

产核糖核酸酶 PA110-7 菌株的筛选与初步鉴定

矫玉翠, 生吉萍, 郑嫣燕, 王正荣, 葛佳, 申琳*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为筛选产核糖核酸酶并且具有抗病毒活性的植物来源的菌株, 并鉴定。本实验从健康的碱蓬中分离到 50 株益生菌, 通过平板显色法筛选得到 9 株产核糖核酸酶的益生菌, 通过噬菌斑法进行复筛得到抗噬菌体率高达 69% 的菌株 110-7。根据菌株的菌落形态、大小、颜色, 革兰氏染色、芽孢染色等观察菌体形态以及生理生化实验、16S rDNA 序列测定进行鉴定, 初步判定该菌株为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

关键词: 碱蓬; 益生菌; 核糖核酸酶; 分离; 鉴定

Isolation and Primary Identification of Ribonuclease-producing Strain PA 110-7 from *Suaedae glaucae* Bunge

JIAO Yu-cui, SHENG Ji-ping, ZHENG Yan-yan, WANG Zheng-rong, GE Jia, SHEN Lin*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to screen and identify ribonuclease-producing strain and evaluate its antiviral activity, 50 probiotics from healthy *Suaedae glaucae* Bunge were isolated and 9 ribonuclease-producing strains were screened by color plate method. The inhibitory activity of strain PA110-7 against *Escherichia coli* was 69%. Based on the analyses of colony morphology, size and color, Gram staining, spore staining, physiological-biochemical characterization and 16S rDNA sequencing, strain PA110-7 was identified as *Bacillus thuringiensis*.

Key words: *Suaedae glaucae* Bunge; probiotics; ribonuclease; isolation; identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0246-04

核糖核酸酶家族某些酶类因其具有特殊的生物学活性和药理功能而一直受到人们的高度重视。自 20 世纪 60 年代起其作为一类模式蛋白被普遍应用于分子生物学研究, 此外发现此类酶还具有控制肿瘤血管生成、杀灭肿瘤细胞及抑制病毒的复制等独特的生物学活性^[1-3], 目前已被成功用于抑制流感病毒的增殖及疱疹的生成, 治疗急性胰腺炎及流行性脑炎等临床治疗实践^[4]。核糖核酸酶广泛存在于生物体内, 在核酸代谢中起着重要的作用。这些酶通过水解核苷酸残基之间的磷酸二酯键而降解核酸, 生成寡核苷酸或单核苷酸。核糖核酸酶的来源可以是动物、植物的组织或器官、或者是微生物。微生物具有产酶周期短、对恶劣环境的耐受力强等特点。因此, 利用微生物发酵方法获得核糖核酸酶已成为研究的热点。

所谓盐生植物, 是指能在高含量可溶性盐(主要为氯化钠)的环境(包括土壤、沼泽、水域)中生长并完成其生活史的植物。特色盐生植物具有提高机体免疫力和

机体耐力、防止四氯化碳肝损伤、调节神经系统和内分泌系统的能力^[5], 近年来常作为抗衰老、抗癌药物使用^[6]。但特色盐生植物野生资源非常稀缺, 特别是近年来的狂采乱挖, 现有的资源已经遭到严重破坏, 特色盐生植物的产量日益下降。为了拯救特色盐生植物资源, 维持生态平衡, 大量研究工作用于解决特色盐生植物人工栽培问题^[7], 但人工栽培比较耗时, 并不是好的解决特色盐生植物资源缺少的根本途径。已有研究表明植物益生菌通过参与植物药物中活性物质的合成, 从而使益生菌产生与宿主相同或相似的生理活性成分^[8]。因此, 从特色盐生植物中筛选益生菌, 研究其是否能够产生核糖核酸酶用于抗癌或抗病毒是对特色盐生植物开发利用的一条很有价值的研究途径。

目前, 国内外对特色盐生植物的研究主要集中在对特色盐生植物化学成分和药理作用的研究^[7], 而关于特色盐生植物益生菌的研究几乎未见报道, 林贞建^[9]对 2 株特色盐生植物内生真菌(CF005 和 AC-6)产的具有神经保护

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200803033)

作者简介: 矫玉翠(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jyc6394310@126.com

* 通信作者: 申琳(1964—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为农副产品综合利用。E-mail: shen5000@gmail.com

活性的次级代谢产物进行了系统研究;目前还没有发现从特色盐生植物中筛选产核糖核酸酶益生菌的研究。本实验对来源于碱蓬的益生菌进行分离、纯化,并通过平板显色法鉴定其产核糖核酸酶的能力,筛选到1株产核糖核酸酶活性高、抗病毒活性强的菌株110-7;进一步对该菌株进行形态学特征的观察、部分生理生化特征的比较测定和16S rDNA鉴定,初步判定该菌株可能为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。

1 材料与方法

1.1 菌种分离源

碱蓬(*Suaeda glaucae* Bunge)于2009—2010年采自新疆地区。

营养琼脂培养基;马铃薯葡萄糖琼脂培养基;核糖核酸酶筛选培养基:使用改良后的变色圈法筛选核糖核酸酶^[10],蛋白胨 15g、大豆蛋白胨 5g、酵母粉 5g、NaCl 5g、调pH7.2,加入RNA 2g、甲苯胺蓝-O 0.1g、琼脂粉 15g、蒸馏水 1000mL,121℃灭菌20min,倒平板待用;噬菌斑实验下层培养基:LB固体培养基;噬菌斑实验上层培养基:含0.7%琼脂糖的水凝胶。

1.2 仪器与设备

YT-CJ-2ND超净工作台 北京亚泰科隆实验科技开发中心;SHP-450生化培养箱 上海森信实验仪器有限公司;LDZX-50KBS立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂;B204TR显微镜 重庆奥特光学仪器有限公司;HZQ-F160全温振荡培养箱 江苏太仓实验设备厂;DYY-6C琼脂糖核酸电泳 北京六一仪器厂;GL212成像系统 Kodak公司;PB-10酸度计 德国Sartorius公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种分离、纯化和保藏

取特色碱蓬块茎,按常规无菌操作进行表面杀菌,无菌水冲洗干净后,一部分切割成1cm³左右的块状,切面向下置于营养琼脂培养基上;一部分在无菌研钵中进行研磨,研磨液进行梯度稀释,各梯度取200μL涂布营养琼脂培养基上。对照为最后一次冲洗液。将研磨样品各设两个梯度(10⁻²、10⁻³)分别放于37℃和28℃培养箱中培养。期间,将长出的菌体用接种针依次转接到新的相应固态培养基上,进行逐步分离纯化。纯化后的菌种转移至相同的培养基的斜面上,培养后4℃保存。

1.3.2 产核糖核酸酶益生菌的筛选

将纯化后的菌株点接到核糖核酸酶初筛平板培养基上,放置于37℃培养箱内24h,观察菌株菌落周围是否存在变色圈,并测量变色圈直径。

核糖核酸酶活力的初步测定:采用杯碟法测定菌株

胞外产物的核糖核酸酶活力,将筛选得到的有变色圈的菌株接种到LB液体培养基内,37℃、200r/min摇床发酵培养12h,将发酵液12000r/min离心10min,收集上清液,0.22μm膜过滤除菌后,得到无菌滤出液。将牛津杯置于核糖核酸酶初筛平板上,每个牛津杯加入无菌滤出液200μL,以灭菌的培养基作为对照,放置于37℃培养箱中,24h后观察有无变色圈,并记录变色圈的直径。

1.3.3 噬菌斑法复筛抗病毒菌株

通过大肠杆菌噬菌斑的变化筛选病毒抑制菌^[11-12]。将噬菌体进行梯度稀释(使得空白对照的噬菌斑数达到100左右),然后以1:1的比例与大肠杆菌液混合,取300μL混合液与300μL 1.3.2节制备的无菌滤出液混合,用移液枪取出全部的液体加入到冷却至45℃左右的0.7%琼脂糖中,迅速混匀后,倒入底层平板中,37℃培养24h,观察噬菌斑产生情况。以无菌水代替细菌发酵滤出液作为空白对照。观察无菌滤出液对噬菌斑数量的影响。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照噬菌斑数} - \text{处理后噬菌斑数}}{\text{对照噬菌斑数}} \times 100$$

1.3.4 菌株鉴定

将产核糖核酸酶的益生菌在LB培养基上培养,观察其菌落形态;通过革兰氏染色^[13]、芽孢染色^[13]观察菌体形态;利用生理生化实验^[13]、16S rDNA^[14]序列测定对菌株进行分类鉴定。

2 结果与分析

2.1 产核糖核酸酶特色碱蓬益生菌分离结果

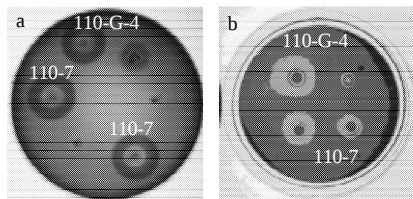
表1 产核糖核酸酶的菌株及筛选平板变色圈直径
Table 1 Screening of ribonuclease-producing strain by color plate method

菌株编号	变色圈直径/mm	菌落直径/mm	发酵液变色圈直径/mm
111-1	12	8	16
111-2	14	8	—
111-6	14	6	14
111-7	14	5	16
81-P-2	12	6	12
110-4	12	7	7
110-7	19	5	18
110-G-4	20	7	—
110-G-6	10	4	12

注:—,无变色圈。

从不同宿主来源的特色碱蓬中分离得到益生菌共50株,用平板显色圈法筛选产生核糖核酸酶的内生细菌,

使用杯碟法测定其菌体和无菌滤出液的变色圈直径,初步量化其产酶能力(表1)。由表1可以看出,筛选到9株产核糖核酸酶的益生菌。其中有7株益生菌的菌体和无菌滤出液都产生了变色圈,110-7菌株和110-G-4菌株的菌体有较大的变色圈,表现出较强的核糖核酸酶活力。但110-G-4菌株的无菌滤出液却没有变色圈,而110-7的菌体和无菌滤出液都有较大的变色圈。



a. 菌株菌体的核酸酶变色圈; b. 发酵液过滤除菌体后的核酸酶变色圈。

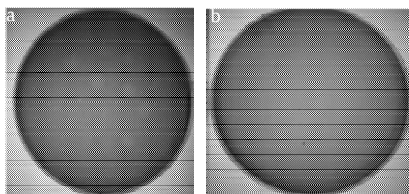
图1 110-G-4和110-7产核糖核酸酶益生菌的筛选平板变色圈

Fig.1 Color zone of ribonuclease-producing strains 110-G-4 and 110-7

由图1可以看出,虽然110-G-4细菌培养物变色圈直径比110-7的大,但无菌滤出液却没有显示出核糖核酸酶活力,那么110-G-4菌株产生的可能为胞内酶;而110-7的菌体和无菌滤出液的变色圈直径都比较大,由此确定110-7菌株的胞外核糖核酸酶的活力比较高。

2.2 噬菌体法复筛抗病毒菌株

将初筛得到的9株产核糖核酸酶的菌株接种到LB液体培养基中,37℃摇床200r/min发酵12h。过滤除菌,与大肠杆菌噬菌体混合后,测定噬菌体对大肠杆菌侵染力的变化。筛选结果表明菌株110-7表现出了明显的抑制噬菌体的作用,抑制率达到了69%,抑菌效果见图2。



a. 未添加110-7菌株发酵液的噬菌斑效果图; b. 添加110-7菌株发酵液(已过滤除菌)后的噬菌斑效果图。

图2 110-7菌株发酵产物对大肠杆菌噬菌体抑制作用

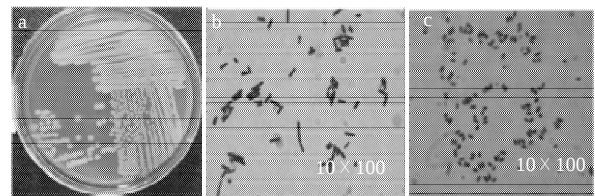
Fig.2 Inhibitory activity of strain 110-7 against *E. coli*

2.3 菌株110-7的鉴定

2.3.1 110-7菌落特征及个体形态特征

菌株110-7在LB培养基上培养24h后,即可形成明显的单菌落。菌株形成约2mm的土黄色单菌落,不透明,表面凸起,光滑,在10×100显微镜下观察110-7

菌株呈直杆状,革兰氏染色阳性菌,芽孢呈椭圆形。



a. 110-7菌落形态; b. 110-7革兰氏染色; c. 110-7芽孢染色。

图3 110-7菌落形态、革兰氏染色及芽孢染色结果

Fig.3 Colony morphology, Gram staining and spore staining of strain 110-7

2.3.2 110-7菌株生理生化特征

110-7株的生理生化特征如表2所示。综合菌株的培养特征和生理生化特征以及蔡妙英等^[13]编著的《常见细菌系统鉴定手册》,初步鉴定110-7菌株可能为苏云金芽孢杆菌。

表2 110-7菌株的生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical characterization of strain 110-7

管号	底物	反应结果	管号	底物	反应结果
0	控制	—	25	七叶灵柠檬酸铁	+
1	甘露醇	—	26	水杨苷	+
2	赤藓糖醇	—	27	D-纤维二糖	+
3	D-阿拉伯糖	—	28	D-麦芽糖	—
4	L-阿拉伯糖	—	29	D-乳糖	+
5	D-核糖	+	30	D-蜜二糖	—
6	D-木糖	—	31	D-蔗糖	—
7	L-木糖	—	32	D-海藻糖	+
8	D-侧金盏花醇 I	—	33	菊粉	+
9	甲基-β-D吡喃木糖苷	—	34	D-松三糖	—
10	D-半乳糖	—	35	D-棉子糖	—
11	D-葡萄糖	+	36	淀粉	—
12	D-果糖	+	37	糖原	+
13	D-甘露糖	—	38	木糖醇	+
14	L-山梨糖	—	39	D-龙胆二糖	—
15	L-鼠李糖	—	40	D-土伦糖	—
16	卫茅醇	—	41	D-来苏糖	—
17	肌醇	—	42	D-塔格糖	—
18	甘露醇	—	43	D-岩藻糖	—
19	山梨醇	—	44	L-岩藻糖	—
20	甲基-α-D吡喃甘露糖苷	—	45	D-阿拉伯醇	—
21	甲基-α-D吡喃葡萄糖苷	—	46	L-阿拉伯醇	—
22	N-乙酰葡萄糖胺	+	47	葡萄糖酸钾	+
23	苦杏仁苷	—	48	2酮基葡萄糖酸钾	+
24	ARBULIN	—	49	5酮基葡萄糖酸钾	—

注: +, 发酵; —, 不发酵。

2.3.3 110-7菌株的分子生物学鉴定

将110-7菌株的16S rDNA的PCR反应产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。测得序列为1452bp。从GenBank中选择了13株菌的16S rDNA基因

序列, 用 MEGA 4.1 软件进行多重比较后构建的系统发育树见图 4。其中, 110-7 株与苏云金芽孢杆菌的相似度达 98%, 因此 110-7 菌株可能是苏云金芽孢杆菌。

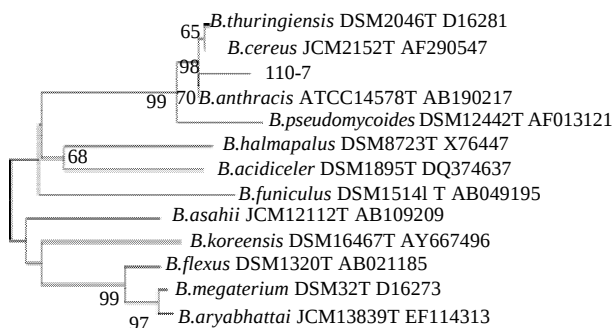


图 4 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain 110-7 and its relative species

3 讨论

植物益生菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的微生物, 被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在症状^[15]。大量研究结果表明: 植物益生菌具有生物防治, 植物促长, 增强宿主抗逆境、抗病虫害、抗菌、抗病毒和抗肿瘤活性等优点^[16-17]。与其他微生物相比, 益生菌不易受外界环境影响, 而且易于在植物体内定植, 已作为一种新的微生物资源而被广泛应用。Stierle 等^[18]首次从短叶红豆杉筛选到一株产紫杉醇的菌株 *Taxomyces andreanae*, 引起了人们对内生真菌抗肿瘤活性的极大兴趣。

目前, 国内外还未见从类似碱蓬中筛选得到内生细菌的报道, 本实验从该种特色碱蓬中筛选到产核糖核酸酶的益生菌。由于益生菌是生长在植物内部组织中的一种微生物, 所以其有可能会在植物内部定植, 那么筛选得到产核糖核酸酶并具有抑制植物病毒增殖作用的益生菌, 对于植物病毒的生物防治具有重大意义。本实验利用平板显色法共筛选得到 9 株产核糖核酸酶的益生菌, 并通过噬菌斑复筛的方法得到一株抑制噬菌体率达 69% 的益生菌株 110-7, 经过菌落形态观察、革兰氏染色、芽孢染色、部分生理生化实验和 16S rDNA 序列分析对菌株 110-7 进行了初步鉴定, 结果表明 110-7 可能为一株苏云金芽孢杆菌。

该特色碱蓬具有很高的医学价值, 但鉴于其资源比较少, 那么从特色碱蓬中筛选具有相同活性成分的植物益生菌来替代特色碱蓬本身就具有很高的研究价值。但目前关于该特色碱蓬中植物益生菌的研究较少, 而本实验从该特色碱蓬中筛选了一株产核糖核酸酶活力高、抗噬菌体率也较高的益生菌, 可为以后的抗癌和抗病毒研究提供材料和依据。

参考文献:

- [1] ILINSKAYA O, DECKER K, KOSCHINSKI A, et al. *Bacillus intermedium* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current [J]. *Toxicology*, 2001, 156(2/3): 101-107.
- [2] ZHANG Ying, LI Weijun, SU Zhiguo. Trends in the pharmaceutical research of ribonucleases and their therapeutic uses[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2001, 18(3): 456-460.
- [3] MAKAROV A A, ILINSKAYA O N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets[J]. *FEBS Letters*, 2003, 540(1/3): 15-20.
- [4] 欧阳平凯. 生物化工产品[M]. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 103-105.
- [5] 方清影, 李慧, 王国华, 等. 对《中华人民共和国药典》2010 年版一部何首乌及其饮片质量标准的修订建议[J]. *北京中医药大学学报*, 2009, 32(12): 849-852.
- [6] 吴建梅, 陈大为, 孙波, 等. 天然活性成分磷脂复合物药理学研究概述[J]. *中国药理学杂志*, 1998(1): 9-11.
- [7] 屠鹏飞, 何燕萍. 肉苁蓉类药源调查与资源保护[J]. *中草药*, 1994, 25(4): 205-208.
- [8] 邹文欣, 谭仁祥. 植物益生菌研究新进展[J]. *植物学报*, 2001, 43(9): 881-892.
- [9] 林贞建. 真菌次级代谢产物的化学多样性开发及生物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [10] 徐定邦, 李文通. 用平板法检测产酶菌株[J]. *微生物学通报*, 1981(4): 196-197.
- [11] 王海俊, 宁苏莉, 王家驹, 等. 抗病毒中药体外筛选噬菌体-细菌模型的初步探索[J]. *中医药通报*, 2005, 4(4): 50-53.
- [12] 张启兴, 童竞亚. 用噬菌体筛选抗癌药[J]. *赣南医学院学报*, 1994, 14(2): 88-100.
- [13] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 姚虹, 吕治, 苏建荣, 等. 不同方法提取阴道加德纳菌细菌基因组 DNA 的比较[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(1): 123-125.
- [15] 石晶磊, 陈维信, 刘爱媛, 等. 植物益生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. *生态学报*, 2006, 26(7): 2395-2400.
- [16] 贾栗, 陈疏影, 翟永功, 等. 近年国内外植物益生菌产生物活性物质的研究进展[J]. *中草药*, 2007(11): 1750-1754.
- [17] BENHAMOU J W. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 919-929.
- [18] STIERLE G S. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260: 214-216.