

一株地衣芽孢杆菌噬菌体的分离及其性质分析

王凤超, 刘文瑶, 王海

(青岛蔚蓝生物科技集团研发中心, 山东青岛 266100)

摘要: 从生产碱性蛋白酶的车间附近的下水道淤泥和后处理车间空气中分离得到了一株噬菌体。电镜观察表明该噬菌体有多面体的头部和细长的尾部组成, 有着长尾病毒科噬菌体的形态特征。在供试菌种中, 该噬菌体以地衣芽孢杆菌为宿主, 对其生理特性研究发现, 该噬菌体在 pH 5~10 之间有着很好的稳定性, 在高温下有一定的稳定性, 且金属离子可以促进其对宿主菌的侵染。根据实验结果绘制出噬菌体的一步生长曲线, 可知感染宿主菌的潜伏期约为 40 min, 爆发期约为 110 min。对噬菌体核酸性质的分析发现, 其遗传物质为双链线状 DNA, 其分子量大约为 36 kb。

关键词: 碱性蛋白酶; 电镜; 噬菌体, 稳定性

文章篇号: 1673-9078(2013)6-1266-1269

Isolation and Characterization of *Bacillus licheniformis* Phage

WANG Feng-chao, LIU Wen-yao, WANG Hai

(R&D Center, Qingdao Vland Bio-tech Co., Ltd, Qingdao 266000, China)

Abstract: A virulent bacteriophage of *Bacillus licheniformis* was isolated from the nearby drainage and air environment of alkali protease producing factory. Electronic microscopy showed that the phage had an isometric head (59 nm in diameter) and a long non-contractile tail (132 nm in length), which indicated the characters of Siphoviridae family. *Bacillus licheniformis* was the host cell for the phage in the test. The study revealed that the phage had good stability at pH 5~10 and certain stability under high temperature. The invasion to the host cell could be accelerated by metal ion. One-step growth kinetics showed that the latent period of the invasion was about 40 min, and the rise period was about 110 min. Double-stranded linear DNA was the genetic material of the phage, with a molecular weight of about 36 kb.

Key words: Alkaline Protease; Electronic microscopy; Bacteriophage; Stability

碱性蛋白酶 (Alkaline Protease) 是一类适宜在碱性条件下水解蛋白质的酶类, 最早发现于猪的胰脏中。1945 年, Dr.Jaag 等人地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中发现了碱性蛋白酶^[1]。碱性蛋白酶是一类重要的工业酶制剂, 广泛的应用于食品, 洗涤及制革等行业, 同时也可以作为饲料酶制剂, 有着重要的经济价值^[2]。

在发酵企业中, 长期生产同一种菌种, 容易在车间环境中滋生出大量的噬菌体, 造成生产中的倒罐, 从而极大地影响生产成本, 造成巨大的经济损失^[3]。我们从本公司生产碱性蛋白酶的生产环境和发酵液中分离得到了一株噬菌体, 并对其特性进行了研究, 以期最终找到防止噬菌体污染的方法提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 供试菌株

收稿日期: 2013-02-21

作者简介: 王凤超 (1981-), 男, 硕士, 研究方向: 发酵工艺优化

通讯作者: 王海 (1967-), 男, 高级工程师, 研究方向: 发酵工艺优化

供试菌种 *Bacillus licheniformis* 2709, 由本公司生产, 其他芽孢杆菌: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*。

1.1.2 培养基

斜面和平板培养基 (g/L): 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, 底层平板和上层平板琼脂分别为 20 g 和 7 g, pH 为 7.0 左右。摇瓶培养基 (g/L) 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g pH 为 7.0 左右。

蛋白胨肉汤培养基 (g/L): 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离, 纯化以及原液制备

从发酵生产车间下水道淤泥, 后处理车间取样与指示菌混匀制备软琼脂平板, 37 °C 培养 12 h 即可见平板上出现噬菌斑, 用枪头挑取斑形各异的单一噬菌体接种于新的含有指示菌的液体培养基中, 扩大培养; 双层平板法重新观察噬菌斑的形状。如此反复多次后, 确定为一种斑形的噬菌体。最后将纯化的噬菌体进行液体扩大培养, 制成效价约为 10^{10} pfu/mL 的噬菌体原液, 加入 5% 的氯仿, 置于冰箱中备用。

1.2.2 噬菌体宿主范围的实验

参考 Adams 的方法,将不同的菌种接种于摇瓶培养基中培养,到生长至对数前期,取效价 10^{10} pfu/mL 以上的噬菌体,按照双层琼脂的方法观察是否形成噬菌斑^[4]。

1.2.3 噬菌体一步生长曲线的绘制

参考 Lu^[5]的方法。

1.2.4 噬菌体的电镜观察

取噬菌体原液(效价达到 10^{10} pfu/mL)作电镜观察。取少量噬菌体悬液滴加于复膜铜网上,然后用2%磷钨酸(PTA, pH=7.0)滴染2 min,用滤纸吸去染液,自然干燥后,置于透射电子显微镜(JEM-100C×II)观察并拍照^[6]。

1.2.5 pH稳定性的测定

配制1%蛋白胨肉汤稀释液,分别用NaOH或HCl调节pH为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13,将不同pH值肉汤4.5 mL加入试管内,置于温度为(37±0.3) °C的水浴锅中,待温度平衡后加入0.5 mL噬菌体液,起始效价为 10^8 pfu/mL,处理30 min后,以pH值为7.0的蛋白胨肉汤液稀释液稀释,按双层琼脂计数。

1.2.6 热稳定性的测定

配制1%蛋白胨肉汤稀释液,用NaOH调pH至7.0,取4.5 mL于试管中,分别置于温度为75 °C、80 °C、85 °C、90 °C的水浴锅中,待温度平衡后加入0.5 mL噬菌体液,起始效价为 10^8 pfu/mL,分别在5 min、10 min、30 min取样,按双层琼脂计数,计算其失活率。

1.2.7 漂白粉处理噬菌体的效果

配制pH 7.0的1%蛋白胨肉汤稀释液,取9 mL的稀释液加入1 mL起始效价为 10^8 pfu/mL的噬菌体原液,加入2%、1%、0.5%浓度的漂白粉,混匀,在5 min、10 min、20 min时取样,采用双层平板法检测其中噬菌体的含量^[7]。

1.2.8 温度对噬菌体吸附的影响

取4.5 mL的相同浓度的菌悬液加入到试管中,分别置于不同温度的水浴锅中(30 °C、40 °C、50 °C)待温度平衡后,加入MOI为0.01的噬菌体,充分混匀保温吸附,然后分别在5、10、15、20、25、30、40 min取样,立即用0.45 μm的滤膜过滤,取100 μL的过滤清液,按照按双层琼脂平板法计数噬菌斑并设对照^[8]。

1.2.9 金属离子对噬菌体吸附的影响

取4.5 mL的菌悬液加入到试管中,分别加入10 mmol/L的CaCl₂和MgSO₄,平衡温度后加入MOI为0.01的噬菌体,充分混匀保温吸附,然后分别在5、

10、15、20、25、30、40 min取样,用0.45 μm的滤膜过滤,取100 μL的过滤清液,按照按双层琼脂平板法计数噬菌斑并设对照^[8]。

1.2.10 噬菌体核酸性质的研究

噬菌体核酸的提取参照J.萨姆布鲁克《分子克隆实验指南》第二版中λ噬菌体DNA提取方法提取噬菌体的核酸^[9]。取100 mL噬菌体裂解液中加入RNase, DNaseI至终浓度为1 μg/mL,37 °C保温30 min以降解细菌的基因组DNA及RNA,反应结束后,加入终浓度为0.5 mol/L的NaCl和10% (m/V)的聚乙二醇8000冰浴1 h。12000 r/min离心20 min,弃上清,将沉淀溶于2 mL SM (NaCl 5.8; MgSO₄·7H₂O 2 g; 1 M pH 7.5 Tris·Cl 50 mL; 2%明胶 5 mL,用ddH₂O定容至1 L)溶液中,入20 μL 10% SDS,20 μL 0.5 M EDTA,65 °C保温15 min,然后用酚氯仿抽提的方法将蛋白质去掉,加入等体积的异丙醇,-20 °C放置1 h,4 °C下12000 r/min离心20 min,收集沉淀,用70%的乙醇洗涤DNA沉淀,12000 r/min离心5 min,弃去70%的乙醇,DNA沉淀室温干燥5 min~10 min,加入20 μL TE缓冲液,使DNA充分溶液,-20 °C保存备用。

核酸类型的测定:将提取的噬菌体核酸分别用DNase I和RNase酶解后进行琼脂糖凝胶电泳分析(胶浓:0.7%,缓冲液:1×TAE,电场强度:4 V/cm)^[10]。

采用限制性内切酶酶切的方法,将噬菌体的DNA酶切后做琼脂糖凝胶电泳分析,切成的片段与标准的分子量Marker做对比,大体上可以确定其分子量^[10]。

2 结果与讨论

采用双层平板法,以*Bacillus licheniformis* 2709为宿主菌,从发酵车间下水道淤泥,后处理车间环境中分离纯化了一株噬菌体。

2.1 噬菌体的宿主范围

分别以其他的生产菌种为宿主菌,通过双层平板的方法确定该噬菌体的宿主菌范围,结果如表1所示:

表1 噬菌体的宿主范围

Table 1 Host range of phage	
菌株	敏感性
<i>Bacillus licheniformis</i> 2709	+
<i>Bacillus pumilus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-

噬菌体具有很强的专一性,一般每种菌有着对应的噬菌体,一种菌的噬菌体并不能侵染同属但不同种

的细菌。我们所分离到的噬菌体是地衣芽孢杆菌的烈性噬菌体，并不能侵染其他种类的芽孢杆菌，如枯草芽孢杆菌，蜡样芽孢杆菌等。

2.2 噬菌体的电镜观察

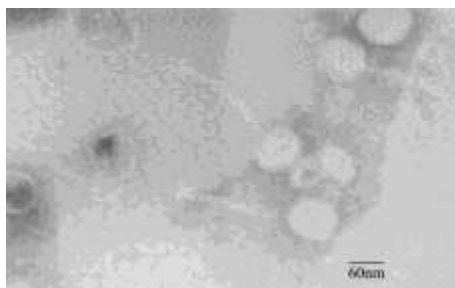


图1 电镜下噬菌体形态 (100000×)

Fig.1 TEM observation of the morphology of the phage

电镜观察表明侵染的噬菌体为典型的蝌蚪状噬菌体，在形态上分为头部和尾部两部分，头部为多面体，直径约为 59 nm，尾部较为细长，无侧鞘，长度约为 132 nm。在形态方面，按国际病毒分类委员会第四次报告的分类标准，该噬菌体有长尾病毒科噬菌体的形态特征。

2.3 噬菌体的一步生长曲线

噬菌体的潜伏期由吸附细菌开始，到细胞释放新的噬菌体为止；当所有的感染细菌均破解释放噬菌体时为爆发期。本研究参考 Lu^[5]的方法，对该噬菌体做了一步生长曲线，如图 2 所示。由图 2 可以看出，该噬菌体的潜伏期约为 40 min，爆发的时间约为 110 min。

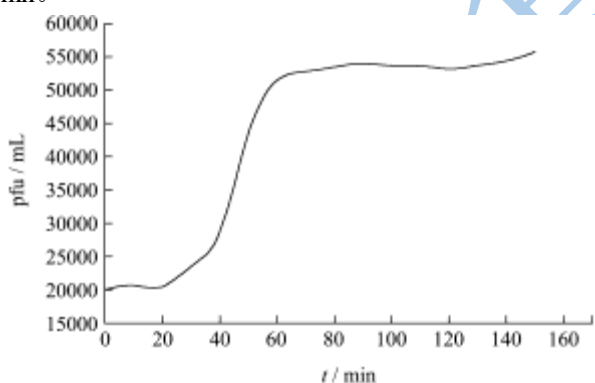


图2 噬菌体的一步生长曲线

Fig.2 One-step growth kinetics of phage

2.4 噬菌体 pH 稳定性的测定

噬菌体在不同 pH 溶液处理后，其活性结果见图 3。由图 3 可以看出，该噬菌体的最适 pH 为 7.0，在 pH 5.0~9.0 范围内有 70% 以上的存活率，适宜 pH 偏向于碱性环境，这可能与其侵染环境（碱性发酵环境）相关。随着酸性或者碱性程度的增强，噬菌体的存活率急剧下降。但是该噬菌体的 pH 存活范围相对较宽泛，在 pH 4.0~10 之间仍有 20% 以上的存活率。在经

pH 2.0 或 12.0 处理后，基本失活。

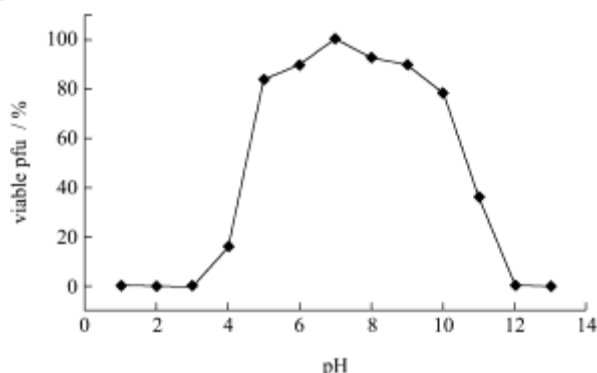


图3 pH对噬菌体存活率的影响

Fig.3 The pH stability of the phage

2.5 温度对噬菌体存活率的影响

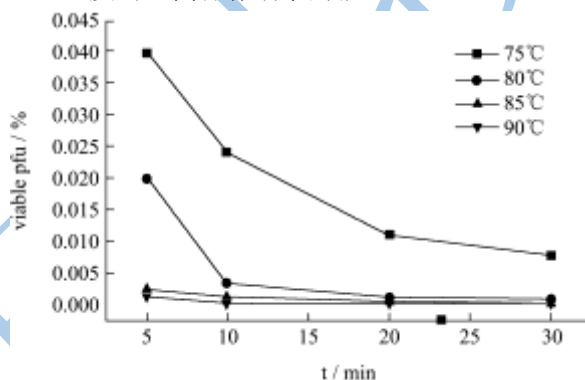


图4 噬菌体的耐温性

Fig.4 Thermostability of the phage

从图 4 的结果可以看出，随温度的增加，热处理对噬菌体的灭活作用明显的增加。在较低的温度下，热处理初期存活率迅速下降，随时间的延长存活率下降的速率减慢；在较高的温度下，存活率下降的速率不明显。同时，该噬菌体在 90 °C，30 min 的条件下仍然有残余的噬菌体。

2.6 漂白粉对噬菌体存活率的影响

根据已有的资料，漂白粉可以有效的杀灭噬菌体，我们对漂白粉处理分离得到的噬菌体的效果进行了研究，发现各个漂白粉浓度梯度的样品中，在 5 min 后取样检测，只有 1~5 个/mL；10 min 后，检测不到噬菌体。这说明，漂白粉对于处理环境中存在的噬菌体有着很好的效果。考虑到漂白粉对发酵设备有腐蚀性，因此，漂白粉可用于工厂环境中的消毒处理。

2.7 影响噬菌体吸附因素的研究

在噬菌体侵染过程中，有很多影响噬菌体吸附的因素，找到这些因素，在生产过程中，可有效的控制噬菌体的侵染，降低生产损失，根据相关的资料，我们选择温度和金属离子对噬菌体吸附的影响进行了研究，相关结果如图 5 和 6 所示。

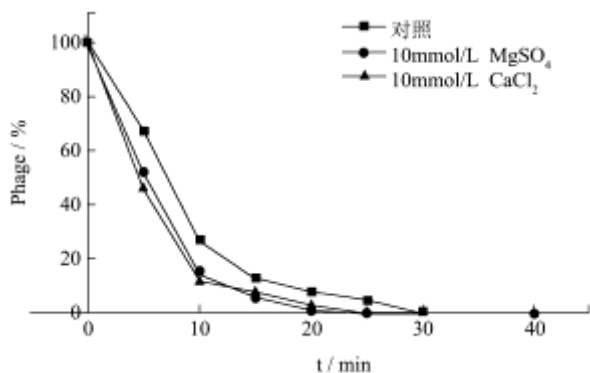


图5 金属离子对噬菌体吸附速率的影响

Fig.5 Influence of metal ion on bacteriophage adsorption rate

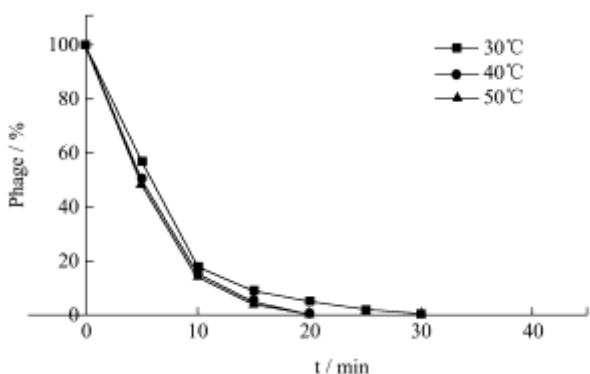


图6 温度对噬菌体吸附速率的影响

Fig.6 Influence of temperature on bacteriophage adsorption rate

由上述的实验结果可以看出,金属离子的添加在吸附开始的一段时间内,能加速噬菌体的吸附。在噬菌体吸附的初期,随温度的升高,吸附速率明显增加,在超过 20 min 后,吸附速率明显降低,具体的机制有待于进一步的研究。

2.8 噬菌体核酸性质的研究

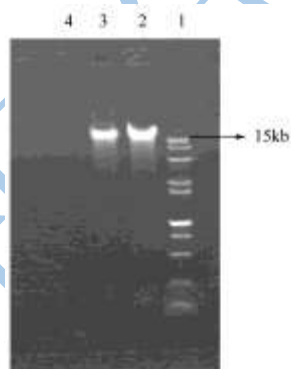


图7 噬菌体遗传物质的酶解实验

Fig.7 Digestion of phage DNA

注: 1: DNA 分子量 Marker; 2: 噬菌体的核酸; 3: RNase 酶解后噬菌体的核酸; 4: DNase I 酶解后噬菌体的核酸。

对噬菌体遗传物质进行了分离纯化。从图7可以看出,该噬菌体的核酸不能被 RNase 酶解,而 DNase I 可以完全降解噬菌体的核酸。由此可以说明,噬菌

体的核酸是 DNA 而不是 RNA。

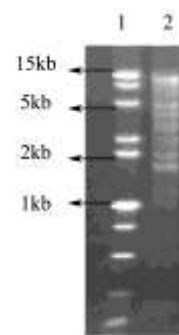


图8 噬菌体基因组经 EcoR I 酶切后的电泳图

Fig.8 Electrophoresis figure of phage genome digestion by EcoR I

注: 1: DNA 分子量 Marker; 2: 噬菌体基因组酶切结果。

噬菌体的 DNA 经过 EcoR I 酶切后产生大约 9 条条带,与标准的分子量 Marker 对比,可以计算出噬菌体 DNA 的分子量大体为 36 kb。同时, EcoR I 为双链 DNA 酶,噬菌体的 DNA 可以被其切开,可以说明噬菌体的 DNA 为双链的。

3 结论

3.1 碱性蛋白酶作为一种重要的工业酶制剂,在日化产品中发挥着重要的作用,但是在发酵生产中容易污染噬菌体,造成生产上的倒罐,带来了巨大的经济损失。从公司的生产环境中分离得到了一株地衣芽孢杆菌的烈性噬菌体,对其特性的研究发现,该噬菌体具有一个多面体的头部和细长的尾部;在 pH5~10 之间有着很好的稳定性, pH 低于 4 或高于 11,其稳定性急剧下降;能够耐受较高的温度,90 °C 加热 30 min 仍有 0.00007% 的残余;在 30~50 °C 之间,吸附速率随温度的升高而增加,在吸附的初期,金属离子有利于增加吸附速率;对其核酸性质的分析发现,其遗传物质为双链线状的 DNA,分子量大约为 36 kb。通过对其性质的研究,可以为治理公司环境内的噬菌体提供依据和帮助。

3.2 解决噬菌体污染主要从以下方面考虑,首先,最有效的办法就是筛选抗噬菌体的菌株,并对其生产特性进行研究,以期得到既能抗噬菌体污染,同时生产性能不降低的菌种。其次,搞好环境卫生,少向环境中排放活菌体,定期喷洒漂白粉消毒等。再次,建立有效的检测体系,定期对公司环境中噬菌体含量进行检测,防止噬菌体污染的突然爆发。

参考文献

[1] 杨金龙,潘康成,赵小林.高产碱性蛋白酶地衣芽孢杆菌的研究进展[J].河南农业科学,2005,1:59-61

- [2] 邓菊云.微生物碱性蛋白酶研究进展[J].现代食品科技, 2008,24(3):293-297
- [3] 陈思杰.稳定提高谷氨酸发酵生产水平的几点做法[J].现代食品科技,2006,22(3):171-173
- [4] Adams M. Bacteriophages [M]. London: Interscience Publishers, 1959
- [5] Lu Z, Breidt F J r, Fleming H P, et al. Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003,84: 225-235
- [6] 那淑敏,贾益兴,余茂劼.一些芽孢杆菌噬菌体的形态和结构[J].微生物学报,1990,30(3):210-215
- [7] 王玉池.噬菌体防治浅见[J].发酵科技通讯,2003,32(1): 78-79
- [8] A Quiberoni, D Guglielmotti, A Binetti, et al. Characterization of three Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus phages and the physicochemical analysis of phage adsorption [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96: 340-351
- [9] Sambrook J F E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第2版) [M].北京:科学出版社,1992
- [10] 李广武,杨朝晖,岳海峰,等.产碱性蛋白酶地衣芽孢杆菌 N16 抗噬菌体菌株筛选及噬菌体 PG3 特性的研究[J].武汉大学学报(自然科学版),1995,41(6):757-763