

文章编号: 1000-5013( 2008) 03-0387-04

# 一株胶原酶产生菌的筛选及系统发育分析

靳鸿蔚, 刘桂兰, 王 耿, 方柏山

( 华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021 )

摘要: 从所采集土样、水样中分离筛选到呈革兰氏染色阳性, 柱状产芽孢编号为 LY-t1 的菌株. 通过对此菌进行牛皮消化实验, 并以 iv 型胶原为底物, 测定该菌发酵培养液中胶原酶活性, 确认此菌具有胶原酶活性. 16S rDNA 序列分析表明, 分离菌株与 *Bacillus megaterium* 具有 98% 相似性. 最后, 用 PHYLIP 程序将该菌株与报道的相关胶原酶产生菌进行系统发育进化分析.

关键词: 巨大芽孢杆菌; 胶原酶; 16S rDNA 序列; 系统发育

中图分类号: Q 939. 124; Q 556<sup>+</sup>. 903; Q 933

文献标识码: A

胶原酶( Collagenase, E. C 3. 4. 24. 3) 是指只作用于胶原或明胶, 而不作用于其他蛋白质的酶类, 微生物来源的胶原酶主要是细菌胶原酶<sup>[1]</sup>. 胶原酶在医学研究中用于治疗胶原沉积性疾病, 细胞培养上可以去细胞外基质, 食品加工中可降解肉食品中过多的胶原使肉制品鲜嫩可口, 环境保护上可用于皮革边角废弃物的转化等, 具有极大的应用价值. 在微生物来源的胶原酶中, 来自 *Clostridium histolyticum*, *Vibrio alginolyticus* 等的胶原蛋白酶已有广泛的研究. 但从巨大芽孢杆菌来源的胶原酶在国内外还未见报道. 本文报道对胶原酶产生菌株的筛选、鉴定.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

iv 型胶原( 美国 Sigma 公司), 其他试剂均为国产分析纯. 土样、水样分别采集于福建泉州的制革厂、屠宰场等地.

### 1.2 培养基

(1) 富集培养基. 明胶, 蛋白胨和 NaCl 的质量浓度分别为 10, 5, 5 g · L<sup>-1</sup>, pH= 7. 5. (2) 筛选培养基. 明胶, 蛋白胨, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, NaCl 和琼脂的质量浓度分别为 20, 5, 0. 5, 0. 2, 0. 1, 15 g · L<sup>-1</sup>, pH= 7. 5. (3) 斜面培养基. 蛋白胨, 牛肉膏, NaCl 和琼脂的质量浓度分别为 10, 3, 5, 20 g · L<sup>-1</sup>, pH= 7. 5. (4) 发酵培养基. 麦芽糖, 酵母膏, 明胶, CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 的质量浓度分别为 20, 1. 5, 10, 0. 2, 2. 5, 0. 5, 0. 5 g · L<sup>-1</sup>, pH= 7. 5.

### 1.3 实验方法

1.3.1 胶原酶产生菌的筛选 参照文[2], 将 1 g 采集的土样和 1 mL 的水样混合后, 加入盛有 8 mL 无菌生理盐水的试管中. 摇匀后, 取 5 mL 悬浮液加入盛有 30 mL 富集培养基的 300 mL 三角瓶中, 于 200 r · min<sup>-1</sup>, 37 °C 摇瓶培养 2 d. 将富集培养液梯度涂布于筛选培养基平板上, 室温培养 2~ 3 d. 酸性汞试剂检验: 选择水解圈与菌落直径比值较大的菌株纯化后转移到斜面培养基上保藏.

1.3.2 牛皮消化实验 将发酵 2 d 的菌株培养液于 4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心机上离心 10 min, 取上层清液. 新鲜牛皮切成约 1 cm × 1 cm 的小块, 加入上层清液, 于 37 °C 摇床振荡, 观察牛皮消化情况.

收稿日期: 2007-11-30

作者简介: 靳鸿蔚( 1983- ), 女; 通信作者: 方柏山( 1957- ), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物生化的研究. E-mail: fangbs@ hqu. edu. cn.

基金项目: 福建省重大科技专项( 2005HZ03-3); 国务院侨务科研基金资助项目( 06QZR07)

1.3.3 胶原酶酶活测定 参照文[3],将0.3 mL的 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  iv型胶原底物,0.2 mL的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(pH=7.5,含 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ )和0.1 mL 发酵酶液在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 中反应20 min后,取出0.1 mL反应液于0.5 mL的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl中以终止反应.采用茚三酮法依次加入0.6 mL的 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸缓冲液和0.6 mL 茚三酮,于570 nm处比色,测定反应所释放的水溶性氨基酸、短肽,空白为加热失活的酶液.

1.4 胶原酶产生菌的鉴定

1.4.1 细菌 DNA 的提取 从筛选菌株的斜面上挑取一环接入种子培养基,于 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下摇瓶培养8~10 h.取1.2 mL种子培养液于1.5 mL Eppendorf 管中,于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心5 min,弃上层清液,下层菌体用TE(Tris-EDTA)缓冲液清洗2次后,加入100  $\mu\text{L}$ 的TE缓冲液.旋涡混匀后,沸水浴7 min, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 浴5 min,于 $16\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心机下离心10 min.上层清液直接用于聚合酶链反应(PCR)扩增模板.

1.4.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序 用于16S rDNA PCR反应的引物为一对通用引物.引物由北京奥科生物技术有限公司合成.正向引物F27/20为 $5'\text{-AgAgTTTgATCATggCTCAg-3'}$ ;反向引物R1492/22为 $5'\text{-TACggTTACCTTgTTACgACTT-3'}$ .PCR反应体系( $20\text{ }\mu\text{L}$ ): $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 $10\times$  PCR缓冲液, $1.6\text{ }\mu\text{L}$ 的 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{MgCl}_2$ , $1.6\text{ }\mu\text{L}$ 的dNTP,引物F27/20和引物R1492/22各为 $1\text{ }\mu\text{L}$ ,模板DNA为 $2\text{ }\mu\text{L}$ ,Taq 酶( $16.67\text{ mkat}\cdot\text{L}^{-1}$ )为 $1\text{ }\mu\text{L}$ ,重蒸水 $9.8\text{ }\mu\text{L}$ .PCR程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ ,5 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$ ,45 s; $54\text{ }^\circ\text{C}$ ,1 min; $72\text{ }^\circ\text{C}$ ,90 s;第2步循环30次; $4.72\text{ }^\circ\text{C}$ ,15 min.PCR产物用OMEGA公司的DNA纯化试剂盒纯化,测序由上海华诺生物科技有限公司完成.

1.4.3 系统发育分析 获得菌株部分长度16S rDNA序列(1194 bp),向GenBank递交该序列(登录号:DQ666685),通过Blast程序与GenBank中核酸数据进行对比分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),利用RDP数据库(<http://rdp.cme.msu.edu>)与软件PHYLIP 3.6构建系统发育树.

已被正式描述的胶原酶产生菌分为3类<sup>[4]</sup>.第1类属于*Clostridium*属、*Vibrio*属,包括*Clostridium histolyticum*<sup>[5]</sup>(溶组织梭菌)、*Clostridium perfringens*<sup>[6]</sup>(产气荚膜梭菌)、*Vibrio alginolyticus*<sup>[7]</sup>(溶藻弧菌)、*Vibrio vulnificus*<sup>[8]</sup>(创伤弧菌)、*Vibrio parahaemolyticus*<sup>[9]</sup>(副溶血弧菌).第2类属于*Alicyclobacillus*属、*Treponema*属,包括*Alicyclobacillus sendaiensis*<sup>[10]</sup>(仙台脂环酸芽孢杆菌)、*Treponema denticola*<sup>[11]</sup>(齿垢密螺旋体);第3类属于*Bacillus*属、*Porphyromonas*属、*Photobacterium*属、*Pseudomona*属和*Mycobacterium*属,包括*Bacillus cereus*<sup>[12]</sup>(蜡状芽孢杆菌)、*Bacillus subtilis*<sup>[13]</sup>(枯草芽孢杆菌)、*Porphyromonas gingivalis*<sup>[14]</sup>(牙龈卟啉单胞菌)、*Photobacterium logei*<sup>[15]</sup>(火神发光杆菌)、*Pseudomonas aeruginosa*<sup>[16]</sup>(铜绿假单胞菌)、*Mycobacterium tuberculosis*<sup>[17]</sup>(结核杆菌).用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株的名称、菌株编号和序列登录号,如表1所示.

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株和相关参比菌株

Tab. 1 Isolated and reference strains used to built up phylogenetic tree					
细菌名称	菌株编号	序列登录号	细菌名称	菌株编号	序列登录号
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	20334299	AB084128	<i>Photobacterium logei</i>	AT CC 15832	X74708
<i>Bacillus cereus</i>	AT CC 27877	Z84581	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	509140	X73964
<i>Bacillus megaterium</i>	30-O-AM-1	AJ784905	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	H 814	AB037563
<i>Bacillus megaterium</i>	LY-t1	DQ666685	<i>Treponema denticola</i>	21586523	AY119692
<i>Bacillus subtilis</i>	Lactipan	AJ277905	<i>Vibrio alginolyticus</i>	RH2	DQ664544
<i>Clostridium histolyticum</i>	174142	M59094	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AT CC 17802T	X74720
<i>Clostridium perfringens</i>	B34	DQ196142	<i>Vibrio vulnificus</i>	AT CC 29307	X74727
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	44689	X52917			

2 实验结果

2.1 菌株的分离

样品经明胶富集培养并筛选分离后,通过酸性汞试剂检验,根据水解圈与菌落直径比值判断菌株所产明胶酶的活力大小.从6份样品中分离到37株产明胶酶菌株.明胶是胶原的变性产物,产明胶酶的菌

株可能产胶原酶<sup>[2]</sup>. 将 37 株菌进行摇瓶发酵培养, 用茚三酮法测定胶原酶的活力. 经反复比较后, 编号为 LY-t1 菌株产酶活力相对较高, 达 125. 69  $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ , 比活力为 80. 52  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ , 且在重复实验的过程中, 酶活力较稳定. 因此, 选择 LY-t1 菌株作为研究出发菌株.

牛皮消化实验表明, 菌株 LY-t1 的发酵液消化牛皮 48 h 后, 牛皮面积约为 0. 5 cm × 0. 5 cm.

2. 2 菌株的鉴定

在光学显微镜下, 观察 LY-t1 菌体的形态特征为柱状, 产芽孢, 孢子中生或近中生, 呈柱状, 孢子囊无明显膨大. 观察 LY-t1 菌株在固体和液体培养基条件下的培养特征, 生长时间均为 48 h, 结果如表 2 所示. 其主要生理生化特征, 结果如表 3 所示. 表 3 中, “+”表示反应结果阳性, “-”表示反应结果阴性.

表 2 胶原酶产生菌的培养特征  
Tab. 2 Morphological characteristics of collagenase strain

固体培养	菌落特征	液体培养	培养特征
大小	1~ 2 mm	菌膜	无
形状	圆形	混浊	混浊
边缘	整齐	沉淀	有
表面	光滑	颜色	黄
高低	微凸	-	-
颜色	乳黄	-	-

表 3 胶原酶产生菌的生理生化特征  
Tab. 3 Physiological and biochemical characteristics of collagenase strain

检测项目	检测结果	检测项目	检测结果
革兰氏反应	+	5% NaCl	+
V. P 反应	+	7% NaCl	+
淀粉水解	+	10% NaCl	-
酪素水解	+	葡萄糖产酸产气	+ / +
乳糖产酸产气	+ / +	蔗糖产酸产气	+ / +

2. 2. 2 菌株的系统发育分析 测序后, 得到长度为 1 194 bp 菌株的 16S rDNA 的序列. 将获得的菌株与一些胶原酶产生菌进行系统发育分析, 得到系统进化发育树的结构, 如图 1 所示. 序列比对的结果表

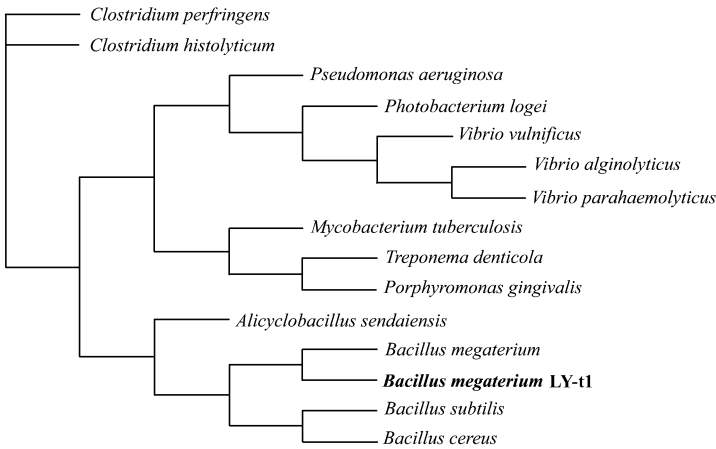


图 1 系统进化发育树结构

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain LY-t1

明, 分离菌株 LY-t1 与 *Bacillus megaterium* 的 16S rDNA 的相似性水平达到 98%, 结合菌株的形态学和生理学特性, 可基本确定分离的菌株为 *Bacillus megaterium*.

3 结束语

本文菌株 LY-t1 为首次报道的具胶原酶活性的巨大芽孢杆菌. 它在碳水化合物培养基上的菌体表现为小球体, 细胞较大, 直径可达 3. 0  $\mu\text{m}$  或更大<sup>[18]</sup>, 可作为判定其属性的依据. 在进一步的工作中, 重点在于胶原酶产生菌放大发酵实验及发酵液中胶原酶性质的研究、粗酶纯化, 以及胶原酶基因的克隆和序列分析, 利用基因工程将克隆到的胶原酶基因导入合适的宿主菌, 使胶原酶获得高效表达.

参考文献:

[ 1 ] HARRINGTON D J. Bacterial collagenases and collagen degrading enzymes and their potential role in human disease[J]. Infect Immun, 1996, 64(6): 1885-1891.

- [2] 金 敏,王忠彦,胡 承,等.产胶原酶地衣芽孢杆菌菌种的分离、筛选及发酵条件研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版,2000,37(5):764-767.
- [3] JOSEPH R M, JOSEPH H D. Purification and characterization of a marine bacterial collagenase[J]. Biochemistry, 1978, 17(14): 2857-2863.
- [4] WATANABE K. Collagenolytic proteases from bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 63:520-526.
- [5] YOSHIHARA K, MATSUSHITA O, MINAMI J, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *colH* gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase[J]. J Bacteriol, 1994, 176:6489-6496.
- [6] MATSUSHITA O, YOSHIHARA K, KATAYAMA S I, et al. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene[J]. J Bacteriol, 1994, 176: 149-156.
- [7] TAKEUCHI H, SHIBANO Y, MORIHARA K, et al. Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase[J]. J Biochem, 1992, 281: 703-708.
- [8] MIYOSHI S, NAKAZAWA H, KAWATA K, et al. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* Metalloprotease: A member of the thermolysin family[J]. Infect Immun, 1998, 66: 4851-4855.
- [9] LEE CY, SU S C, LIAW R B, et al. Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology, 1995, 141: 2569-2576.
- [10] TSURUOKA N. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain: Purification, characterization, gene cloning and heterologous expression[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 162-169.
- [11] SORSA T, DING Y L, LINDY O, et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase[J]. J Clin Periodontol, 1995, 22: 709-717.
- [12] LUND T, GRANUM P E. The 105 kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 178: 355-361.
- [13] NAGANO H. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis*[J]. Biosci Biotech Biochem, 2000, 64: 181-183.
- [14] LAWSON D A, MEYER T F. Biochemical characterization of *Prophyromonas gingivalis* collagenase[J]. Infect Immun, 1992, 60: 1524-1529.
- [15] BANG S S, BAUMANN P N. Phenotypic characterization of *Photobacterium logei* (sp. nov.), a species related to *P. fischeri*[J]. Curr Microbiol, 1978(1): 285-288.
- [16] WELLISCH G, et al. Simple method for collagenase determination in 38 *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. J Clin Microbiol, 1984: 1020-1021.
- [17] CHANG J C, WYSOCKI K M, TCHOU-WONG N, et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases[J]. Thorax, 1996(51): 306-311.
- [18] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所的《伯杰细菌鉴定手册》组, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.

## Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis of a Collagenase Strain from *Bacillus megaterium*

JIN Hong-wei, LIU Gu-lan, WANG Geng, FANG Bai-shan

(Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** A collagenase strain named LY-t1 was isolated from soil and waste water samples of leather factory. Collagenolytic activity was detected using collagen iv as the substrate. The phylogenetic analysis based on 16S rDNA suggested strain LY-t1 was the closest relative of *Bacillus megaterium* with 98% sequence identity. The phylogenetic analysis was performed by PHYLIP. This paper first reports *Bacillus megaterium* strain LY-t1 is a collagenase strain.

**Keywords:** collagenase; *Bacillus megaterium*; 16S rDNA sequence; phylogenetic analysis

(责任编辑: 黄仲一      英文审校: 陈国华)