

摘 要

随着传统抗生素的大量应用发现其对动物机体有不同程度的毒害作用，且致病菌对抗生素产生耐药性，人们正在努力寻找抗生素的替代品。多粘类芽孢杆菌（*Paenibacillus polymyxa*）是一种革兰氏阳性菌，其代谢产物包括胞外多糖、水解酶、抗菌化合物等，广泛应用在植物生长促进、畜禽饲料、生物防治和工业用途的新型生物活性代谢物等领域。CP7 菌是一株高效分泌抗菌物质的多粘类芽孢杆菌，前期研究发现其对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌有较强的抗菌活性。为更好的对 CP7 菌进行开发利用，本试验对 CP7 菌的抗菌稳定性以及对 3 种畜禽肠道病原微生物的抗菌机理进行了研究，同时对 CP7 菌进行了全基因组和代谢组测序分析，并对植酸酶基因进行了克隆和表达，结果如下：

1. 培养 48 h 的 CP7 菌液在 50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃加热 10 min 后仍具有抗菌作用；CP7 菌体沉淀在保存 14 周后对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 仍保持抗菌活性，但随时间延长，抑菌圈逐渐变小，抑菌活性逐渐降低；冻干后的 CP7 对大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 和金黄色葡萄球菌相较于冻干前相对活性为 92%、80%。将 CP7 冻干粉干燥保存在置于 25℃、4℃、-20℃和-80℃下，保存 18 周后对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 K₁₂D₃₁ 依然具有抑菌活性。

2. CP7 菌对猪霍乱沙门氏菌、大肠杆菌 O78 和鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈为 7.45、7.45、7.28 mm，效价为 2625.39 U/mL、1158.52 U/mL、1142.31 U/mL。采用二倍稀释法测得其最小抑菌浓度（MIC）分别为 12.50%、25.00%、50.00%，在扫描电镜下观察发现，CP7 菌作用下的猪霍乱沙门氏菌细胞表面变得粗糙、凹陷，细胞间出现粘连；细胞表面形成孔洞，细胞内容物渗漏，菌体变得干瘪、皱缩。

3. CP7 的全基因组有一条环形染色体，有两个线性质粒。质粒全长 87849 bp 和 60148 bp，染色体全长 5804148 bp，G+C 含量为 45.58%，编码 5126 个基因，编码基因序列长度 5126769 bp，约占全基因组 88%。鉴定了 110 个 tRNA，鉴定了 42 个 rRNA，有 14 套 16S/23S/5S rRNA 操纵子区域。antiSMASH 数据库检索到 14 个次级代谢产物相关的基因簇，其中推测含 4 个抗菌物质，分别 Polymyxin、Fusaricidin、Tridecaptin、Paenilan。

4. CP7 的代谢组共检测到了 1051 个代谢物。其中检测到抗菌物质 polymixin B，

并推测含苯酚（Phenol）、鞘氨醇(Sphinganine)、肌肽（Carnosine）等具有抗菌活性的挥发性化合物。

5. 以 *P. polymyxa* CP7 基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，克隆出 phy 基因长度为 1654 bp，进行信号肽预测和三维同源建模，然后把信号肽切割的 phy 基因在大肠杆菌中表达，SDS-PAGE 电泳检测到酶分子量在 48 kDa 左右，与基因片段的预测蛋白分子量对应一致。

关键词：多粘类芽孢杆菌；CP7 菌；全基因组测序；畜禽肠道微生物

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
μM	Micromoles per liter	微摩尔/升
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
<i>P. polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	多粘类芽孢杆菌
AMPs	Antimicrobial peptides	抗菌肽
bp	base pair	碱基对
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
phy	phytase	植酸酶
NRPS	Nonribosomal peptide synthase	非核糖体肽合成酶
d	Days	天
ddH ₂ O	Double steaming water	双蒸水
DEPC	Diethyl pyrophosphate	焦磷酸二乙酯
PGPR	plant growth-promoting rhizobacteria	植物根际促生细菌
PKS	polyketide synthase	聚酮合成酶
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
g (mg/ μg)	gram (milligram/microgram)	克 (毫克/微克)
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
h	Hour	小时
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
L (mL/ μL)	Liter (milliLiter /microliter)	升 (毫升/微升)
LB	Luria broth	LB 培养基

续英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
M	mole/liter	摩尔/升
mA	milliampere	毫安
min	minute	分钟
mM	millimole/liter	毫摩尔/升
NCBI	National Center for Biotechnology Information	国家生物技术信息中心
OD	Optical density	光密度值
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代吡喃 半乳糖苷
r/min	Speed per minute	每分钟转速
IAA	indole-3-acetic acid	吲哚-3-乙酸
s	second	秒
SEM	Scanning Electron Microscope	扫描电子显微镜
Tris	Trimethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
G ⁺	Gram Positive bacteria	革兰氏阳性菌
G ⁻	Gram Negative bacteria	革兰氏阴性菌
V	Voltage	伏特

目 录

1 前言	1
1.1 多粘类芽孢杆菌概述及其生物活性代谢物	1
1.1.1 植物激素	1
1.1.2 胞外多糖	1
1.1.3 生物化肥（固氮）	2
1.1.4 2,3-丁二醇	2
1.1.5 抗菌物质	3
1.1.6 胞外酶	3
1.2 多粘类芽孢杆菌抗菌物质的应用	4
1.2.1 在畜牧业方面的应用	4
1.2.2 在水产养殖方面的应用	5
1.2.3 在昆虫方面的应用	5
1.2.4 植物病害的生物防治	5
1.2.5 食品添加剂	6
1.3 微生物基因组学和代谢组学	6
1.4 植酸酶	8
1.5 论文研究思路	9
2 材料与方法	10
2.1 材料	10
2.1.1 载体及菌株	10
2.1.2 主要药品试剂	10
2.1.3 主要试剂盒	10
2.1.4 主要试剂的配置	10
2.1.6 主要仪器	12
2.2 方法与步骤	13
2.2.1 CP7 菌液的抗菌特性测定	13
2.2.2 CP7 菌液的冻干干燥	14

2.2.3 CP7 菌对畜禽肠道病原微生物的抑菌活性研究	14
2.2.4 CP7 菌的全基因组测序	15
2.2.5 CP7 菌的代谢组测序	16
2.2.6 植酸酶 phytase 基因的克隆	18
2.2.7 植酸酶 phytase 基因表达载体的构建及表达	22
2.2.8 SDS-PAGE 蛋白电泳	24
3 结果与分析	26
3.1 CP7 菌液的抗菌特性测定	26
3.1.1 CP7 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 K ₁₂ D ₃₁ 的抗菌活性	26
3.1.2 CP7 热稳定性测定	27
3.1.3 保存条件对 CP7 菌液抑菌活性的变化	31
3.1.4 CP7 菌液的冻干干燥	32
3.2 CP7 菌液对畜禽肠道病原微生物的抑菌活性	34
3.2.1 CP7 对畜禽肠道病原微生物的抑菌活性	34
3.2.2 效价测定	36
3.2.3 CP7 对畜禽肠道病原微生物的最小抑菌浓度测定	37
3.2.4 CP7 对猪霍乱沙门氏菌作用的扫描电镜观察	38
3.3 CP7 全基因组测序	40
3.3.1 CP7 基因组注释	40
3.3.2 CP7 基因组抗菌物质基因	44
3.3.3 四组多粘类芽孢杆菌基因组比较分析	45
3.4 CP7 代谢组测序	46
3.5 CP7 植酸酶 phytase 基因的克隆及表达	47
3.5.1 phy-cp7 基因生物信息学分析	47
3.5.2 phy-cp7 基因 PCR 扩增	50
3.5.3 PCR 验证与测序检验	50
3.5.4 phy-cp7 成熟肽基因 (phy2) 的 PCR 扩增	51
3.5.5 重组质粒 pET-28a-phy2 双酶切鉴定	52
3.5.6 phy2 基因诱导表达及 SDS-PAGE 电泳检测	52

4 讨论与结论	54
4.1 讨论	54
4.1.1 多粘类芽孢杆菌 CP7 抗菌特性	54
4.1.2 CP7 菌体冻干干燥	54
4.1.3 CP7 菌对畜禽肠道病原微生物的抑菌活性研究	55
4.1.4 CP7 菌的全基因组测序和代谢组测序	56
4.1.5 植酸酶的克隆与表达	57
4.2 结论	57
参考文献	59
附录 A: 基因组质粒图	68
附录 B: 目的基因测序比对图	69
附录 C: 目的基因测序	71
致 谢	73

1 前言

1.1 多粘类芽孢杆菌概述及其生物活性代谢物

多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 是著名的革兰氏阳性菌 (Gram Positive bacteria G^+), 属于类芽孢杆菌属。为杆状细菌, 产椭圆形芽孢, 兼性厌氧, 如果在 R2A 琼脂培养基平板上生长 2 天, 菌落形状大致长成为圆形, 半透明状, 表面微微凸起。

1880 年多粘类芽孢杆菌被发现, 后来以多种名称为人所知。最先开始它被命名为多粘梭菌, 但由于它具有杆状细胞, 于 1889 年改为多粘芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa* (Padda *et al.*, 2017)。1993 年, 对芽孢杆菌属的比较 16S rRNA 序列分析导致重新分类新的类芽孢杆菌属。它与芽孢杆菌属的密切关系反映在它的名字上, *Paene* 在拉丁语中是几乎的意思, 因此 *Paenibacillus* 的意思是几乎是芽孢杆菌 (Langendries *et al.*, 2021)。它主要存在于土壤里或者根际、植物组织中, 但也有从海洋环境和发酵食品中分离出来 (Padda *et al.*, 2017)。多粘类芽孢杆菌代谢产物包括胞外多糖 (EPS)、水解酶、抗菌物质等, 在植物生长促进、畜禽饲料、生物防治和工业用途的新型生物活性代谢物等领域占据首位。

1.1.1 植物激素

许多属于多粘类芽孢杆菌的细菌是植物生长促进根际细菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), 具有促进植物生长和抑制植物病原体的潜力, 并已被用作生物控制剂 (BCA) (胡琼等, 2020)。*P. polymyxa* 促进植物生长在很大程度上是由植物激素的产生介导的, *P. polymyxa* 中含有负责吲哚乙酸合成的关键基因, *P. polymyxa* 菌株可在体外产生生长素吲哚-3-乙酸 (IAA) (Li *et al.*, 2020)。Figueiredo (2008) 研究发现, 多粘类芽孢杆菌和热带根瘤菌共接种可以缓解菜豆的干旱胁迫, 因为该菌株通过增加叶片脱落酸(ABA)含量等植物激素平衡来缓解干旱胁迫带来的负面影响。基因组挖掘显示 *P. polymyxa* RP31 菌株中的由于含有用于 IAA 生物合成的吲哚-3-丙酮酸脱羧酶的 *ipdC* 基因, 从而使 *P. polymyxa* RP31 表现出强大的植物定殖和植物生长促进能力 (Ali *et al.*, 2021)。

1.1.2 胞外多糖

P. polymyxa 的胞外多糖 (EPS) 已在体外和体内研究中被证明具有广泛的生物活

性，例如抗癌、抗氧化、抗菌、抗炎、免疫调节和益生菌等活性，以及许多突出的理化特性，如低特性黏度、高粘结力、高水溶性、成膜能力和高生物相容性等。一些 EPS 被发现可以降低小鼠肝脏的氧化应激，并在体外抑制胃癌细胞的生长(Grady *et al.*, 2016)。研究发现 *P. polymyxa* PYQ1 产生的 EPS 可在化妆品领域用于修复紫外线辐射后的皮肤 (Liyaskina *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020)。*P. polymyxa* 2020 能生产 levan 型 EPS，基于其功能生物材料，用于生物工程在内的广泛应用 (Liyaskina *et al.*, 2021)。EPS 还诱导小麦幼苗根毛的变形，与细菌附着在植物根上有关，并帮助提高植物对生物和非生物胁迫的抗性，*P. polymyxa* 92 生产的 levan 型 EPS 具有金属结合能力，在水溶液中具有低粘度和植物生长调节活性 (Grinev *et al.*, 2020)。此外，与植物中的多糖相比，细菌 EPS 是一种天然产物，可大量生产，成本较低，提取过程也较为简单。因此，近几十年来，微生物 EPS 在生物材料、医药、食品、化妆品等行业越来越受到重视。

1.1.3 生物化肥（固氮）

PGPR 支持植物生长的一种方法是增加对氮、磷酸盐或铁等营养物质的获取，这种现象被称为生物施肥。众所周知，为作物提供合成化学肥料可以促进其生长和产量。但这种增长促进伴随着不可持续的环境成本。细菌促进植物生长和生物固氮为化肥提供了潜在的替代品，从而有助于可持续农业，将对环境的影响降至最低 (Naher *et al.*, 2021)。*P. polymyxa* 菌株能够固定大气中的氮并将其提供给寄主植物，从而增加植物的氮含量。*P. polymyxa* P2b-2R 可以成功地定殖油菜的根际和内部组织，并改善其物理特性（高度、生物量和花芽出现），从而促进油菜的生长 (Puri *et al.*, 2016)。Li 等人发现 *polymyxa* WLY78 可以显著提高黄瓜根和芽的长度和干重，黄瓜植物从 *P. polymyxa* WLY78 进行的固氮中获得了 25.93% 的氮，结果表明，*P. polymyxa* WLY78 的固氮作用在促进植物生长方面起着重要作用，而它产生的磷酸盐溶解和 IAA 产生可能在促进植物生长方面发挥次要的作用 (Li *et al.*, 2022)。

1.1.4 2,3-丁二醇

2,3-丁二醇 (2,3-BDO) 是一种用途广泛的大众化学品，用于化妆品、制药、聚合物、燃料和能源行业。其旋异构体包括左旋 (2R,3R)、右旋异构体 (2S, 3S) 和内旋异构体 (2R,3S) 三种不同形式。2,3-BDO 的防冻性能，使其具有特殊的工业应用价值。*P. polymyxa* PM 3605 最初被用于以粗甘油为主要碳源，以甘蔗糖蜜为次要底物生产

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/798056073067007023>