
参赛队员姓名: 于镇铨 陈贝琳 林子健

学校: 广州市第六中学

省份: 广东省

国家/地区: 中国

指导老师姓名: 宋建陵 田新朋

论文题目: 深海环境中高产蛋白酶菌株的新发现

深海环境中高产蛋白酶菌株的新发现

于镇铨 陈贝琳 林子健

(广州市第六中学)

摘 要

深海环境中的稀有、新颖的微生物种类众多, 部分微生物能分泌出具有水解深海环境中稀有的或难降解蛋白质功能的蛋白酶, 这类仅在深海环境中存在的蛋白酶也是最具有科研价值和开发前景的蛋白酶。目前, 寻找和发现高产酶活的深海原核微生物菌株, 确定最佳产酶优化条件, 进而鉴定其物种和推广酶的应用是国际前沿研究热点和主流方向。

论文对南海深海的沉积物的高产蛋白酶菌株进行研究。首先设计产酶选择性分离培养基, 继而开展样品涂布培养、产酶菌株的反复选择, 从深海沉积物中分离出蛋白酶活性较强、生长迅速、易于培养的菌株 70 多株, 选取蛋白酶活性较强或圈径比最大的 10 株进行了二次产酶活性优化, 菌株圈径比最高提升达 84%。

其次对圈径比大于 5 的高产酶活性强的 2 株菌株最佳产酶条件再次优化, 圈径比又提升了 55-63%。利用透射电子显微镜观测了高产蛋白酶菌株的显微结构, 对优化的高产菌株经扩增 16S rRNA 基因序列后进行基因测序, 确定为芽孢杆菌属的 5 个菌种, 发现了一个潜在的新物种 (编号 S09-45)。最后对产酶基因进行扩增和测序, 并进行蛋白酶结构进行预测, 发现高产菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 为枯草芽孢杆菌蛋白酶 E, 其水解蛋白能力强, 应用前景广阔。

本论文自行设计了寻找产酶微生物的“优中选优”实验方案, 确定南海深海沉积环境中微生物最佳产酶优化条件, 我们选择出 10 株高产蛋白酶的菌株并进行了结构观测和基因测序, 首次在南海深海发现了 1 个潜在新物种, 测定水解蛋白能力强的三个菌株为枯草芽孢杆菌蛋白酶 E, 为新型蛋白酶酶制剂的研发、应用提供了重要有价值资料。

关键词: 高产蛋白酶, 优化条件, 基因测序, 菌株新发现, 蛋白酶结构预测

目 录

一、研究背景	1
二、研究目的	2
三、技术路线与实验设计	2
四、实验材料、仪器与试剂	4
4.1 实验材料	4
4.2 实验仪器	4
4.3 实验试剂	5
五、步骤与结果	5
5.1 实验一：深海沉积物中产蛋白酶菌株的筛选	5
5.1.1 实验步骤	5
5.1.2 实验结果	6
5.2 实验二：高产蛋白酶菌株的培养与分离纯化	8
5.2.1 实验步骤	8
5.2.2 实验结果	10
5.3 实验三：高产蛋白酶菌株的 DNA 提取与测序	11
5.3.1 实验步骤	11
5.3.2 实验结果	12
5.4 实验四：高产蛋白酶的基因扩增与蛋白结构预测	14
5.4.1 实验步骤	14
5.4.2 实验结果	14
5.5 实验总结	17
六、主要创新点	19
七、心得与体会	19
八、思考与展望	20
参考文献	21
致谢	22
团队介绍	23
指导老师	24
学术诚信声明	25

一、研究背景

在生物和化学的课程中, 我们了解到人体所需要蛋白质, 经过蛋白酶的水解后蛋白质更易于吸收, 蛋白酶对促进蛋白质的高效吸收、减少人类饥荒具有重要意义。蛋白酶是对蛋白质或多肽作用的一类物质, 通过催化肽键水解蛋白质或多肽。按照来源, 蛋白酶划分为微生物蛋白酶、植物蛋白酶、动物蛋白酶、其他来源的蛋白酶; 按产地, 蛋白酶可划分陆地环境和海洋环境的蛋白酶。

人类一直广泛利用的动物、植物来源的蛋白酶, 已无法满足当代社会人们的需求, 而研究、开发和利用微生物蛋白酶恰逢其时。微生物源的蛋白酶, 在生存环境和种类方面, 与植物、动物源的蛋白酶相比较, 具有很多突出优势。首先, 微生物的繁殖速度非常快, 每 30 分钟它们就可以繁殖一代, 数量增长惊人; 其次微生物的种类非常繁多, 功能稀有多样, 预示着微生物蛋白酶的物种很多, 需要不断地去研究和发现。

通过查阅资料, 我们获知海洋环境水体、沉积物中微生物都产生蛋白酶。海洋特别是深海环境, 是人类尚未开发和利用的领域, 蕴含着亟需攻克的关键科学问题。海洋环境相较于陆地环境, 地貌更加多样性、理化环境具有复杂性, 孕育了与陆地截然不同的生态系统和生物群落。因深海贫营养的特性促使其进化出能产生多种胞外蛋白酶的微生物, 降解深海环境中存在的难利用营养物质, 来满足和维系自身生长的需要, 这种特殊环境的微生物具有陆生微生物不具有的、新的代谢机理和生理特性, 是潜在的可利用的重要生物资源。

目前科研人员主要研究极端环境, 比如深海高温、无营养的沉积环境微生物产生的蛋白酶, 这些酶有特殊结构和功能, 今后有广泛用途。从微生物中提取出的蛋白酶, 其生长不受物源、环境和空间的限制, 具有动物蛋白酶和植物蛋白酶所无可比拟的优越性。但不是所有微生物产出蛋白酶的效能都一样, 有的高产, 有的少产甚至不产。

资料表明, 科学家对海洋环境蛋白酶的研究还比较薄弱, 对南海深海沉积物中高产蛋白酶的微生物筛选与优化研究的工作比较少, 鲜有在南海深海环境中发现高产蛋白酶的微生物的报道。那么在, 南海海洋环境中, 是否存在尚未被发现的高产蛋白酶的微生物? 通过怎样的方法才能获取, 如何进行鉴定和确定新菌种?

它们的应用前景如何?

带着这些好奇、疑惑和求知欲望, 我们开展资料查询和向专家、老师请教, 在中国科学院南海海洋所热带海洋生物资源与生态重点实验室副主任田新朋研究员(博士导师)和广州第六中生物高级教师宋建陵老师(华南师范大学硕士研究生导师)指导下, 我们对深海沉积物中的蛋白酶微生物进行分析和研究, 去寻找、探究和发现南海沉积物中的高产蛋白酶微生物。

二、研究目的

我们查阅文献知道, 对蛋白酶新物种的发掘是研究焦点和热点, 主要通过分离纯化、寻找遴选、优化发酵条件, 或通过诱变育种或构建基因工程菌等多种手段, 经过多次培养、优化和筛选, 才能获得高产蛋白酶或产特异功能的活性蛋白酶的优良菌株。新发现的物种, 自身携带新的基因和功能, 能产生新的化合物, 构建了新的代谢机理, 具有新的生理特性。寻找和优化特殊环境中特殊功能的微生物, 是解决当前生物资源开发不足的重点研究领域, 也是攻克稀有生物酶种类少或活性低、稀有活性化合物难发现等的关键。

我们选择采集自南海深海环境的两个沉积物样品, 希望通过培养基筛选出具有蛋白酶活性的菌株, 再通过二次筛选的方式获得蛋白酶活性较强的菌株。通过 16S rRNA 基因测序方法, 对筛选出的目标菌株进行测定, 获得其属种信息, 进而发现和确定新物种, 对遴选的高产酶菌株的产酶基因进行扩增、测序、分析和蛋白结构预测, 为后期研究和开发利用奠定重要基础。

三、技术路线与实验设计

本研究选取南海深海沉积环境样品, 选用牛奶培养基、酪素 2216E 培养基为蛋白酶产生菌选择性分离的培养基。通过稀释涂布和培养的方法, 筛选出高产蛋白酶的活性多菌; 经过分离纯化后再进一步进行产酶活性条件优化, 通过“优中选优”的方式获得蛋白酶活性较强的菌株。我们利用 16S rRNA 基因序列方法, 对筛选出的目标菌株进行分类鉴定, 获得高产酶活力的新菌株的属种信息, 发现新品种, 为后期研究提供重要的基础资料(图 1)。

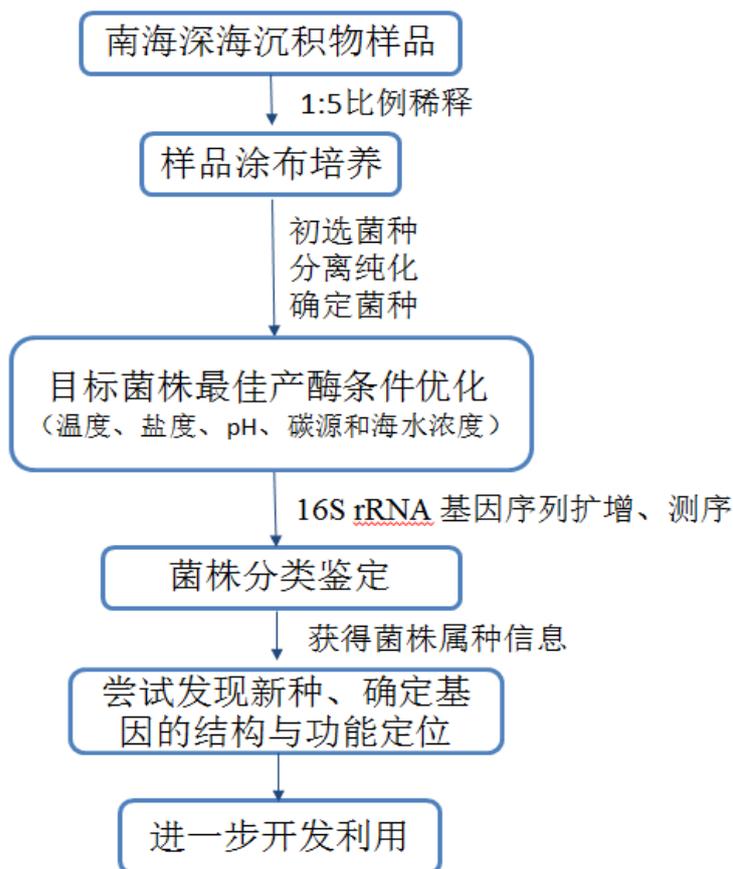


图 1 技术路线图

为完成研究目标，按照技术路线我们设计了以下实验：

表 1 设计的实验及实验目的

序号	实验名称	实验目的
实验一	深海沉积物中产蛋白酶菌株的筛选	选出圈径比最大的菌株进行优选和分离纯化
实验二	高产蛋白酶菌株的培养与分离纯化	选出高产蛋白酶的菌株
实验三	高产蛋白酶菌株的 DNA 提取与测序	鉴定菌种属种信息，尝试新发现
实验四	高产蛋白酶的基因扩增与蛋白结构预测	确定基因的结构与功能定位

四、实验材料、仪器与试剂

4.1 实验材料

供研究的深海沉积物样品于 2016 年南海科学考察航次采集, 按照微生物样品储运标准进行运输和冷藏, 16ZBS09、16XB70 样品站位的经纬度和水深见表 2 和图 2。

表 2 筛选与优化微生物蛋白酶的沉积物站位信息表

序号	样品号	经度 (°E)	纬度 (°N)	水深 (m)	采样日期	水深环境
1	16ZBS09	117.062	20.077	1781	2016.09	深海
2	16XB70	111.503	13.050	2769	2016.09	深海

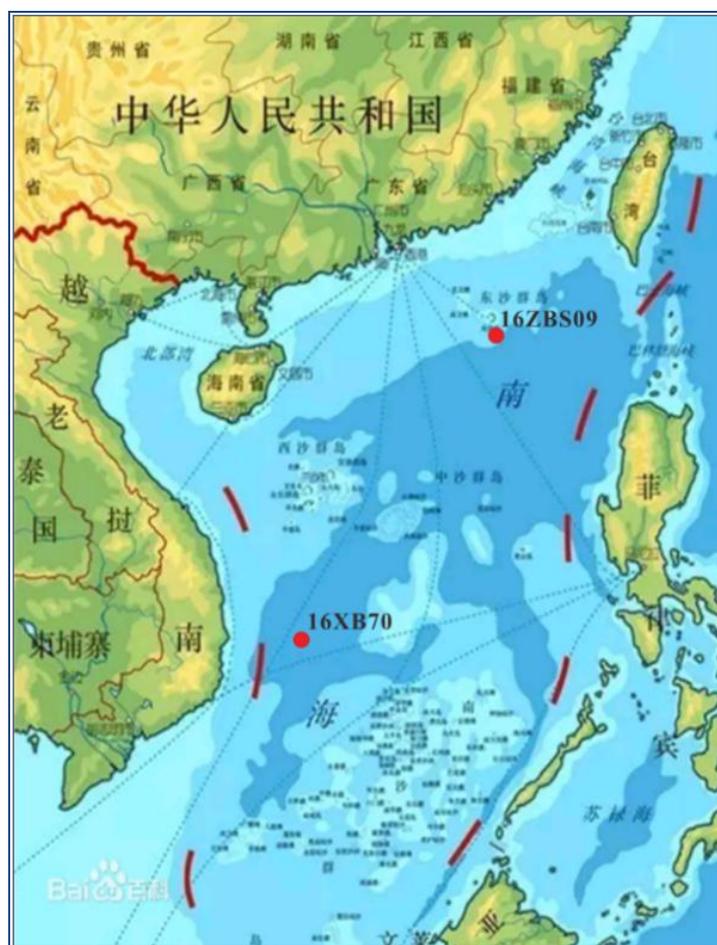


图 2 实验的深海样品来源图

4.2 实验仪器

本项目用到的主要仪器: 松下高压全自动蒸汽灭菌器 (松下 MLS-3781L)、高精度恒温培养箱 (ESCO low temperature BOD incubator)、超净工作台 (ESCO

Laminar Flow Cabinet)、高精度电子分析天平、德国 Eppdoff 梯度 PCR 扩增仪 (Eppendorf Mastercycler pro)、凝胶电泳仪 (BIO-RAD)、BIO 凝胶成像仪 (BIO-RAD Gel Doc XR⁺) 和电子扫描显微镜。

4.3 实验试剂

脱脂奶粉, 琼脂, Premix Taq (全式金, 北京), 细菌 16S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3'), 1492R (5'-CGG TTA CC TTGTTACGACTT-3')。

五、步骤与结果

5.1 实验一：深海沉积物中产蛋白酶菌株的筛选

我们用涂布棒均匀涂抹了 100 多个牛奶平板, 放置于恒温 28℃ 培养箱中培养了 48 小时, 获得了可供初筛的菌株 (图 4)。



图 4 对产蛋白酶菌株进行培养和筛选

5.1.1 实验步骤

- (1) 冷藏保存的沉积物取出 5g, 与灭菌海水以 1:5 的比例稀释, 混匀。
- (2) 用手摇动 1-2 分钟, 待摇匀后, 用吸液枪吸取 200 μ L 至培养皿中, 用涂布棒涂抹均匀。
- (3) 将做好的平板 (图 5), 轻轻放置在 28℃ 培养箱中培养, 培养时间为 2 天, 即 48 小时。
- (4) 用肉眼仔细观察培养好的平板, 仔细挑选出通过牛奶培养基上培养后产生水解圈的单菌落。
- (5) 对每个菌落进行编号并用尺子测量水解圈直径与菌落直径 (图 5), 在实

验本上记录数据, 通过计算求出蛋白酶水解圈直径与菌落直径的比值, 并记录和分析。



图 5 16ZBS09 样品中菌种初筛形貌

5.1.2 实验结果

通过对 100 多株产酶菌株的圈径比的分析 (图 6), 挑取了其中的 70 株进行了详细的测量和记录, 其中 16ZBS09 样品中为 55 株、16XB70 样品中为 15 株, 具体信息如表 3、4 和图 5 所示, 获得的 70 株是具有蛋白水解活性、珍贵的深海微生物菌株, 菌株圈径比最高达 84%。

表 3 16XB70 样品中具蛋白酶活性的菌株信息

16ZBS09 样品	水解圈直径 mm	菌落直径 mm	比值
XB70-1	13	11	1.18
XB70-2	7	4	1.75
XB70-3	13	6	2.17
XB70-4	12	8	1.50
XB70-5	5	2	2.50
XB70-6	16	14	1.14
XB70-7	6	8	0.75
XB70-8	8	3	2.67
XB70-9	7	2	3.50
XB70-10	11	7	1.57
XB70-11	3	0.5	6.00
XB70-12	15	13	1.15
XB70-13	4	2	2.00
XB70-14	6	4	1.50
XB70-15	9	7	1.29

表 4 16ZBS09 和 16XB70 样品中具蛋白酶活性的菌株信息

16ZBS09 样品	水解菌落			16ZBS09 样品	水解圈菌落		
	圈直 径mm	直直 径mm	比值		直直 径mm	直直 径mm	比值
S09-1	9	6	1.50	S09-29	10	7	1.43
S09-2	6	3	2.00	S09-30	8	4.5	1.78
S09-3	5	4	1.25	S09-31	11	7	1.57
S09-4	7	4	1.75	S09-32	11	7	1.57
S09-5	4	3	1.33	S09-33	6	3.5	1.71
S09-6	8	4	2.00	S09-34	5.5	3	1.83
S09-7	8	2	4.00	S09-35	5.5	3	1.83
S09-8	4	2	2.00	S09-36	6	1	6.00
S09-9	5	3	1.67	S09-37	6	3.5	1.71
S09-10	6	3	2.00	S09-38	13	8.5	1.53
S09-11	5	2	2.50	S09-39	9	5	1.80
S09-12	5	4	1.25	S09-40	9.5	4	2.38
S09-13	6	4	1.50	S09-41	8.5	4	2.13
S09-14	4	3	1.33	S09-42	9	4.5	2.00
S09-15	5	3	1.67	S09-43	12	7.5	1.60
S09-16	7	3	2.33	S09-44	9	3.5	2.57
S09-17	7	2	3.50	S09-45	8	3	2.67
S09-18	6.5	3	2.17	S09-46	9	5	1.80
S09-19	12	5	2.40	S09-47	6.5	2	3.25
S09-20	8	5	1.60	S09-48	5	2	2.50
S09-21	7	5	1.40	S09-49	6.5	4	1.63
S09-22	7	4	1.75	S09-50	10	4	2.50
S09-23	4	3	1.33	S09-51	8.5	3.5	2.43
S09-24	7	5	1.40	S09-52	3	0.5	6.00
S09-25	4	3	1.33	S09-53	14.5	6	2.42
S09-26	4	2	2.00	S09-54	8.5	3.5	2.43
S09-27	11	4	2.75	S09-55	1.5	0.6	2.50
S09-28	7.5	4	1.88				

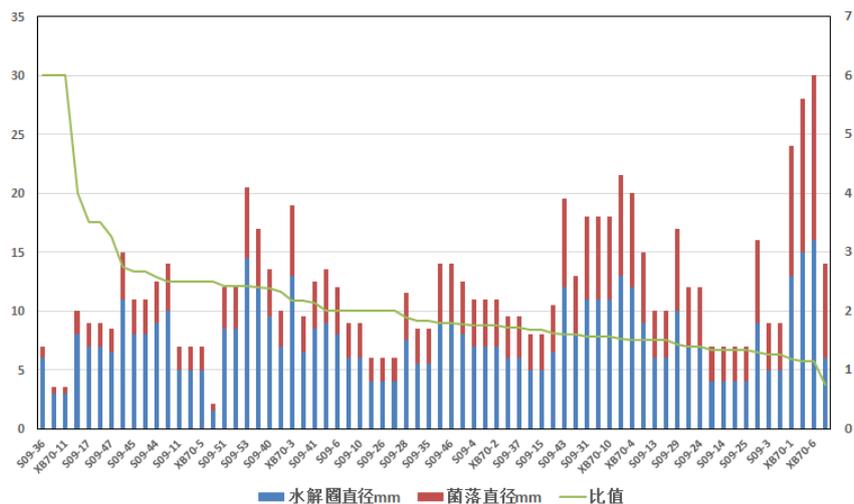


图 6 择选菌株水解圈、菌落直径及圈径比的高产酶菌株

在两个深海沉积物样品中,水解圈大于 10mm 的菌株有 15 株,其中 16ZBS09 样品中有 9 株, 占统计数的 16.4%, 16XB70 样品中有 6 株, 占统计数的 40.0% (图 6)。由表 3、4 中还可看出, 圈径比为 2 及以上的有 32 株, 其中 16ZBS09 样品中有 26 株, 16XB70 样品中有 6 株; 圈径比为 2.5 及以上的有 11 株, 在两个样品中数量基本相当。选 16ZBS09 样品中 6 株和 16XB70 样品中 4 株共 10 株圈径比值比较最大的菌株进行第二次优选分析。

5.2 实验二：高产蛋白酶菌株的培养与分离纯化

5.2.1 实验步骤

选取 S09-52 和 S09-7 样品中水解圈直径与菌落直径差值最大菌株, 取 1/3 菌落大小的菌体, 分别置于温度、NaCl 溶液、pH、碳源和海水中培养, 希望能找到高产蛋白酶菌株。

①温度: 采用牛奶培养基, 分别接种在复筛结果中圈径比最大的两株菌 S09-52 和 S09-7, 在 0-55℃ (每个梯度间隔 5℃) 下培养 2 天, 观察、记录和其圈径比, 结果见图 7a。

②盐度: 在牛奶培养基中加入不同浓度 (w / v) 的 NaCl, 浓度范围 0-30% (每个梯度间隔 2.5%), 分别接种菌株 S09-52 和 S09-7, 在 28℃ 培养箱中培养 2 天, 观察其圈径比 (图 7b)。

③pH 液: 在牛奶培养基中添加缓冲溶液, 配制成 pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、

pH 8、pH 9、pH 10 等 7 种不同溶液, 分别接种菌株 S09-52 和 S09-7 并在 28℃ 培养箱中培养 2 天, 观察其圈径比 (图 7c)。

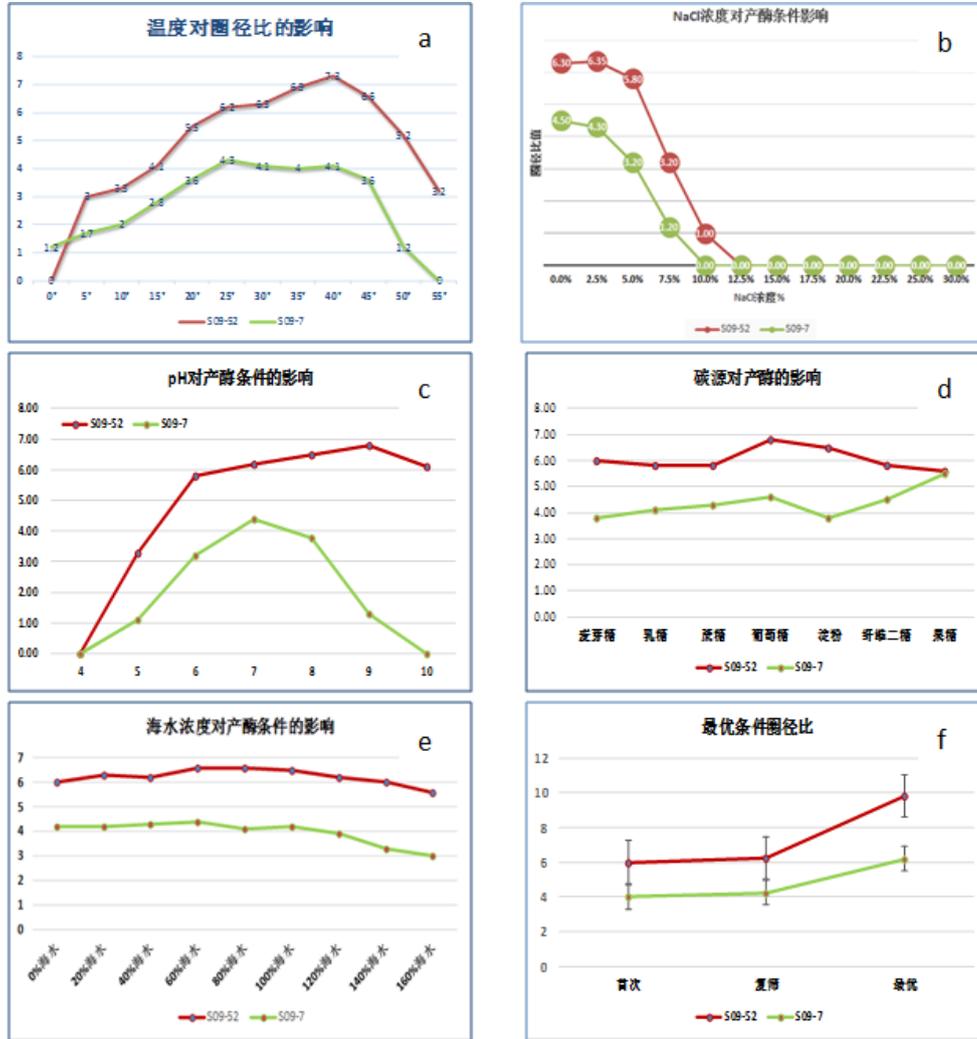


图 7 温度 (a)、NaCl 浓度 (b)、Ph 值 (c)、碳源 (d) 和海水浓度 (e) 菌株 S09-52 和菌株 S09-7 产酶影响及活性提升对照图 (f)

④碳源: 在牛奶培养基中, 选取 7 种浓度为 0.5% 的不同的碳源, 分别为麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖、淀粉、纤维二糖和果糖, 分别接种菌株 S09-52 和 S09-7 并在 28℃ 培养箱中培养 2 天, 观察其圈径比 (图 7d)。

⑤海水浓度: 在牛奶培养基中加入不同比例的海水, 分别是 0-160%, 每个梯度间隔 20%, 海水比例超出 100% 时加热蒸发海水至特定体积, 形成浓缩海水。在 28℃ 培养箱中培养 2 天, 观察其圈径比 (图 7e)。

5.2.2 实验结果

第二次菌株培养后, 样品 16ZBS09 中的菌株形状均为圆形, 表面光滑; 样品 XB70-3 中的菌株, 形状为圆形—不规则椭圆形, 表面光滑或不光滑 (图 8), 其中 3 个平板 (XB70-3、XB70-8 和 XB70-9) 长满菌株, 表明这 3 株菌株在与其他菌株相比, 在相同条件下生长迅速, 能够快速水解牛奶平板上的蛋白。



图 8 挑选出的 10 个菌种复筛的形貌

表 5 复筛后得到 10 个菌株形态特征

菌株编号	颜色	菌落直径 mm	水解圈直径 mm	比值	形状	表面 (光滑/ 不光滑)
XB70-3	透明	2	90	45	圆形	不光滑
XB70-8	透明	2	90	45	圆形	不光滑
XB70-9	乳白	9	90	10	椭圆	光滑
XB70-11	乳白	9	51	5.67	椭圆	光滑
S09-7	乳黄	4	17	4.25	圆形	光滑
S09-17	黄	4	15	3.75	圆形	光滑
S09-45	乳黄	5	19	3.8	圆形	光滑
S09-52	乳白	4	25	6.25	圆形	光滑
S09-54	黄	4	15	3.75	圆形	光滑
S09-55	乳白	7	25	3.57	圆形	光滑

从图 7 中可以看出, 温度对目标菌株的产酶优化条件为约 40℃、NaCl 浓度是 25%, pH 对目标菌株的产酶条件影响最佳为 pH7。海水浓度对目标菌株产酶条件影响不大, 碳源中的葡萄糖对目标菌株产酶条件有一定影响。对目标菌株产酶情况在最佳条件优化 (温度约 40℃、NaCl 浓度是 25%、pH7) 后, 产酶菌株

的圈径比提升了 55-63% (图 7f), 酶活均有显著的提高 (图 9), 达到了预期的效果。从两次筛选结果看, 筛选和优化选取出菌落直径明显大于其他菌落, 具备生长迅速、易于培养的能力的 10 个菌株 (图 9), 它们的水解圈直径与菌落直径的比值范围为 3.57-45, 具有稳定的蛋白高产特性或高活性的生理学特性, 这些菌株为下一步产蛋白酶菌株的鉴定和产酶基因的克隆实验打下了基础。

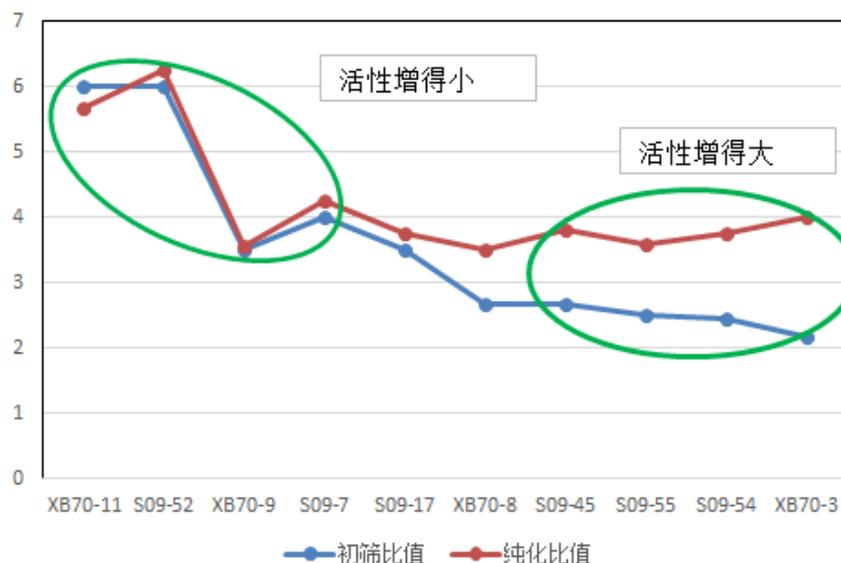


图 9 两次择选菌株的水解圈与菌落间圈径比

5.3 实验三：高产蛋白酶菌株的 DNA 提取与测序

5.3.1 实验步骤

(1)对二次筛选和优化出的 10 株蛋白酶活性强的菌株,我们通过 Chelex-100 试剂法,从菌株中提取出基因组 DNA,将少量菌体挑入 Chelex-100 试剂的离心管中,放置在沸水浴中保持 15min,取出冷却后,放在 12000rpm 转速的离心机中离心 10 分钟。上清液为蛋白酶菌株基因组 DNA。

(2)采用细菌 16S rRNA 基的通用引物: 27F (5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CGG TTA CC TTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 特异性扩增,从而获得的 16S rRNA 基因产物。将产物送专门的基因测序公司完成基因测序。

(3)通过 NCBI 数据网站对测定的基因序列信息进行比对分析。

5.3.2 实验结果

对选出的 10 株菌株的 16S rRNA 基因序列进行测定, 经过 NCBI 数据网站比对, 获得与该 10 株高产酶活菌株亲缘关系最相近的已知菌种属种信息, 比对结果见表 6。从表 6 可以看出, 测定的菌株经鉴定后全部属于芽孢杆菌属, 与已知 5 个物种相近, 但其中 S09-45 菌株的 16S rRNA 基因序列, 相似性与已知物种的国际标准相比, 低于 98%。因此, 我们确认发现了潜在新物种菌株, 这在南海深海极端环境中属于首次。

表 6 16S rRNA 基因序列比对获得的最相近菌种信息表

菌株编号	相近属种信息	16S rRNA 基因序列相似
S09-7	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	100
S09-17	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	99.86
S09-45	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	97.6
S09-52	鲁蒂杆菌 <i>Bacillus luti</i> TD41(T)	100
S09-54	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	99.93
S09-55	脱氮芽孢杆菌 <i>Bacillus nitratireducens</i>	100
XB70-3	高地芽孢杆菌 <i>Bacillus altitudinis</i>	99.86
XB70-8	高地芽孢杆菌 <i>Bacillus altitudinis</i>	100
XB70-9	厦门芽孢杆菌 <i>Bacillus xiamenensis</i>	100
XB70-11	鲁蒂杆菌 <i>Bacillus luti</i> TD41(T)	100

利用获得 16S rRNA 基因全序列图谱, 通过 Mega 7.0 软件构建了 10 株芽孢杆菌的系统发育树状图 (图 10), 结果显示与 16S rRNA 比对结果完全一致, 进一步证明了该 10 株细菌为 *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus luti*, *Bacillus nitratireducens*, *Bacillus altitudinis* 和 *Bacillus xiamenensis* 五个物种的菌株, 确定了这 10 株深海产酶微生物的分类谱系, 其中菌株 S09-45 形成了单独的分支, 与已知菌种显示出较远的亲缘关系 (图 10), 显示出潜在新物种的系统发育地位, 新物种需要进行分子、化学等分析后才能确定。

我们选取高产蛋白酶中其中的 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 菌株, 在透射电

子显微镜下进行观测, 我们观察了菌体的形态(图 11), 确定菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 均为杆状。

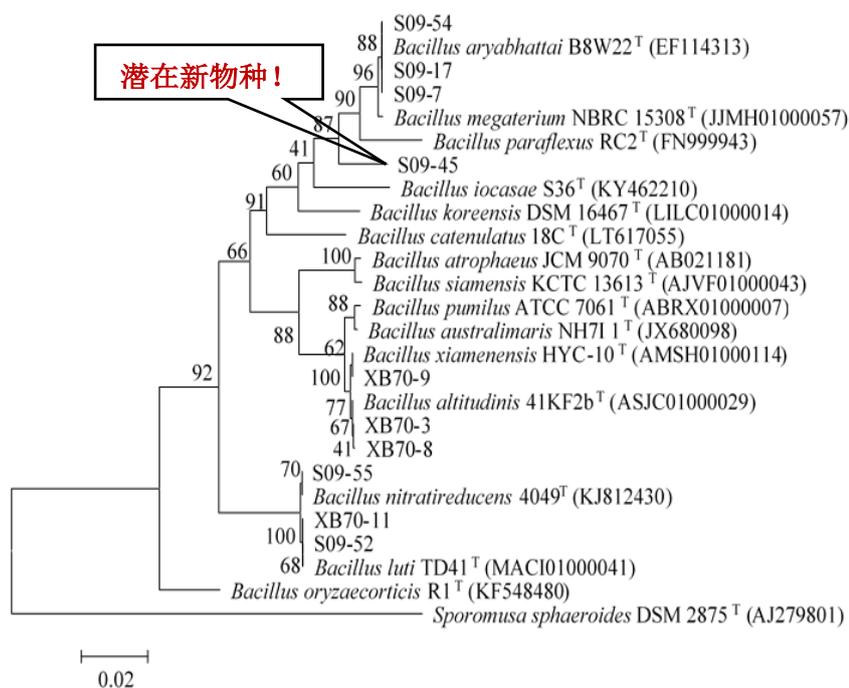


图 10 发现新种及具有蛋白酶活性菌株的系统发育树(基于 16S rRNA 基因序列)

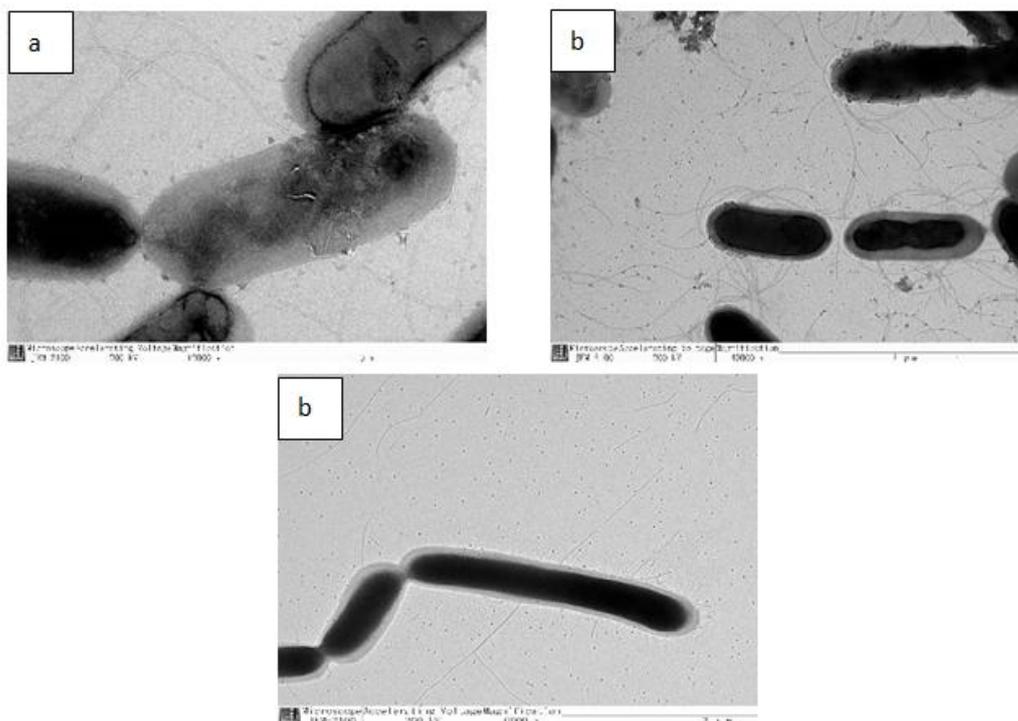


图 11 菌株 XB70-3 (a)、菌株 XB70-8 (b)、菌株 XB70-9 (c) 透射电子显微镜

5.4 实验四：高产蛋白酶的基因扩增与蛋白结构预测

5.4.1 实验步骤

(1) 选取在第二次筛选实验中水解圈与菌落直径比值较大的菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9。

(2) 通过查阅文献和 NCBI 网站上同物种基因组信息, 运用软件 Primer Premier 5 设计蛋白酶引物 K1 (5'-AATCTTTACGATGGCGTTCAGCA-3') 和 K2 (5'-TTATTGTGCAGCTGCTTGTACGT-3')。

(3) 我们采用蛋白酶引物 K1 和 K2 方法, 对菌株基因组 DNA 进行 PCR 特异性扩增蛋白酶基因, 送广州天一辉远基因科技有限公司进行菌株基因测序。

(4) 通过 SWISS-MODEL 网站对测定的蛋白酶基因序列信息进行比对分析和蛋白酶结构预测。

5.4.2 实验结果

我们查阅了 NCBI 数据库中 *Bacillus altitudinis* GQYP101 菌株的全基因组信息(序列号 NZ_CP040514), 发现它的基因组大小为 3.89Mb, GC 含量为 41.29%, 由一个环状 DNA 和一个质粒组成, 含有编码基因 4027 个, 其中蛋白编码基因 3837 个。

NCBI 数据库中 *Bacillus xiamenensis* VV3 的基因组(序列号 NZ_CP017786) 大小为 3.64Mb, GC 含量为 41.5%, 含有编码基因 3811 个, 其中蛋白编码基因 3811 个。我们根据已经报道的芽孢杆菌蛋白酶基因序列(序列号 AY708655), 结合 NCBI 网站上 *Bacillus altitudinis* GQYP101 和 *Bacillus xiamenensis* VV3 菌株的全基因组信息, 采用软件 Primer Premier 5 设计的蛋白酶引物, 由广州天一辉远测序公司合成引物 K1 和 K2。以菌株 XB70-3、XB70-9 和 XB70-8 的总 DNA 为扩增模板, 通过引物 K1 和 K2 获得蛋白酶基因产物, 对照琼脂糖凝胶电泳检验扩增产物, 可知蛋白酶基因产物长度为 1200bp 左右(如图 12)。

蛋白酶基因测序得到的 DNA 序列, 通过 SWISS-MODEL 网站进行蛋白酶结构预测与构建, 蛋白酶结构预测结构与比对结果见图 13-15。

菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 的蛋白酶基因都与数据库中的 3whi.1.A 蛋白具有最近的相似度, 相似度分别为 85.51%、86.08% 和 95.45%。数据库中的资料显示 3whi.1.A 蛋白为枯草芽孢杆菌蛋白酶 E, 具有水解蛋白的能力, 与菌株

XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 的蛋白酶功能一致，进而我们解析出菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 蛋白酶结构预测 3D 图。

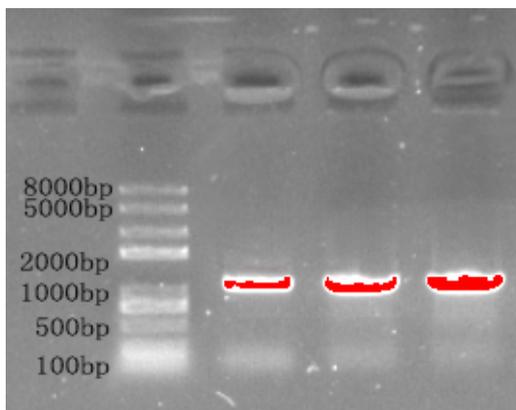


图 12 琼脂糖电泳显示菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 的蛋白酶基因条带 (标红区域)

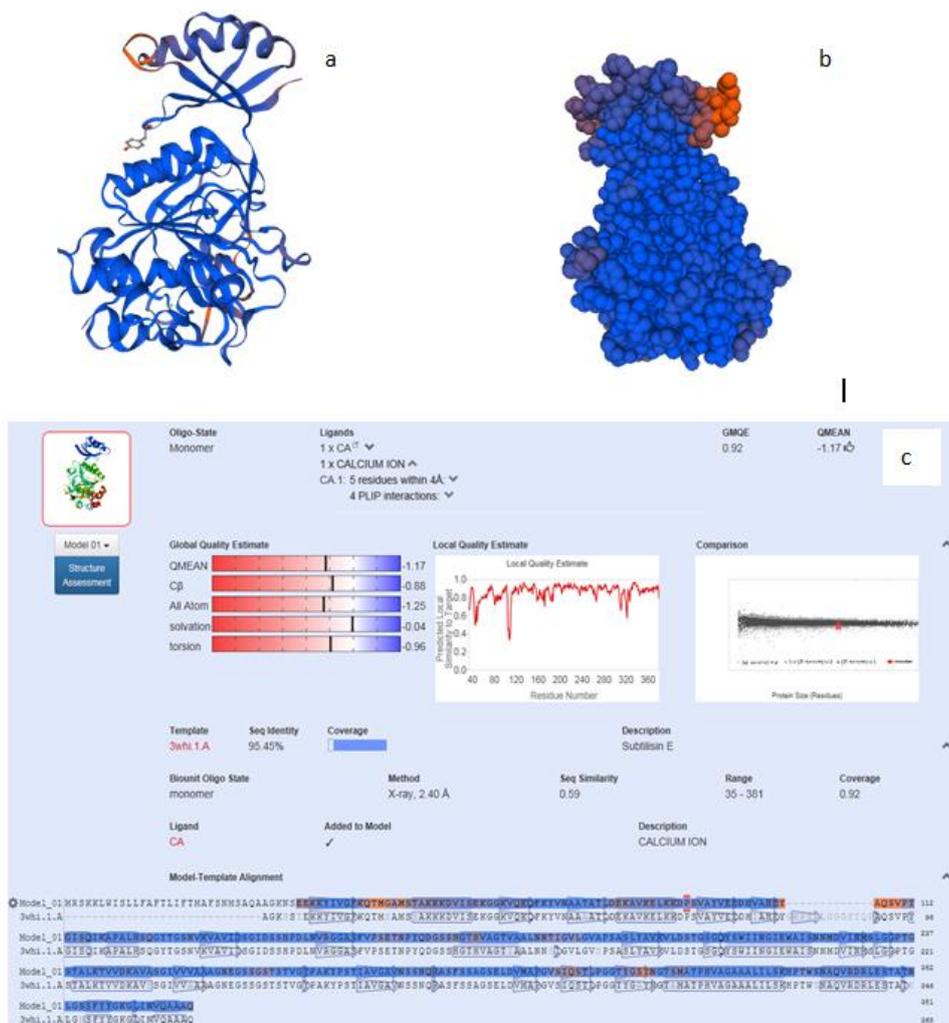


图 13 菌株 XB70-9 蛋白酶结构预测 3D 图(a,b)和比对结果 (c)

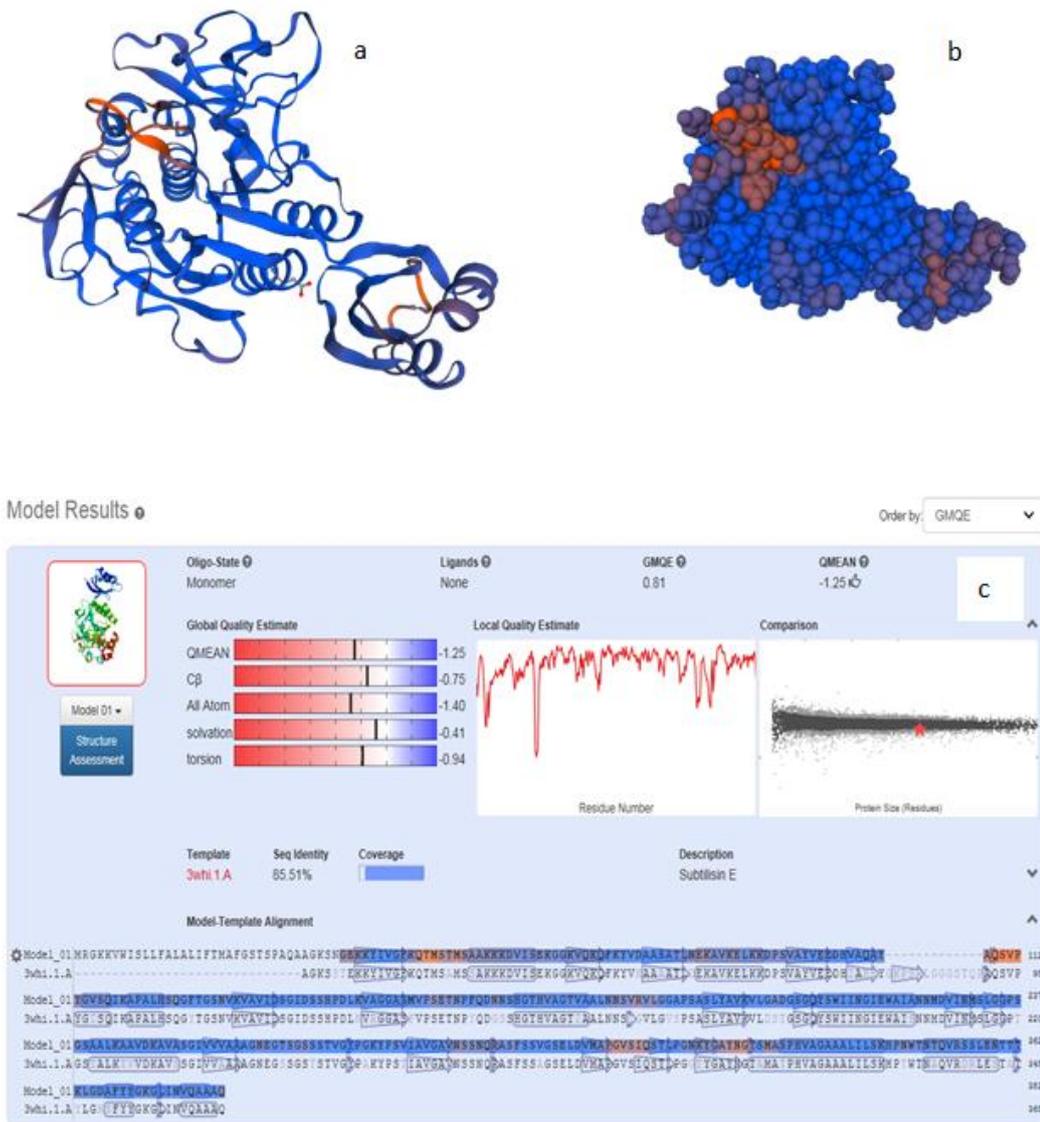


图 14 菌株 XB70-8 蛋白酶结构预测 3D 图(a,b)和比对结果 (c)

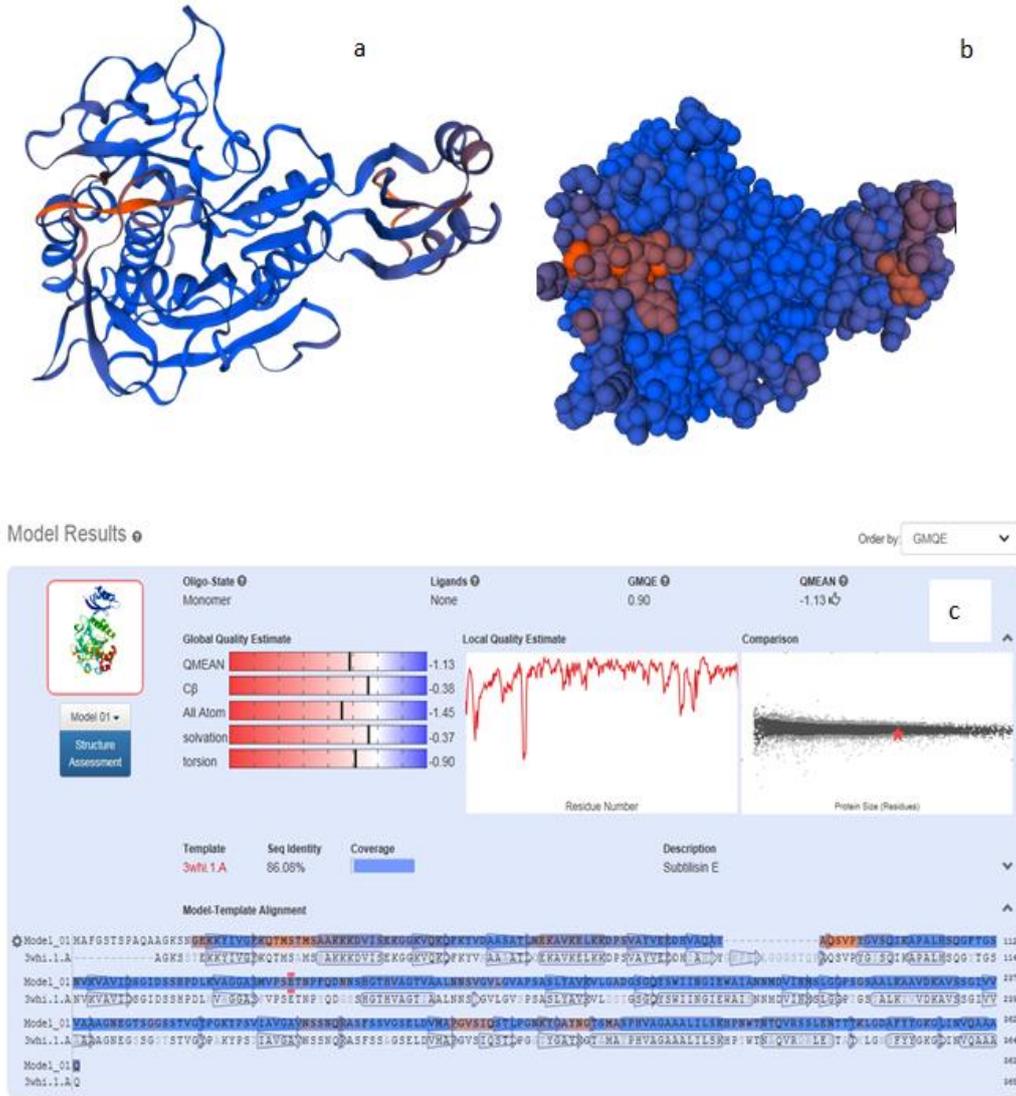


图 15 菌株 XB70-8 蛋白酶结构预测 3D 图(a,b)和比对结果 (c)

5.5 实验总结

(1) 完成了实验设计的各项目标，达到预期效果。

序号	实验名称	实验结果
实验一	深海沉积物中产蛋白酶菌株的筛选	从样品中选出 10 株圈径比最大的菌株
实验二	高产蛋白酶菌株的分离纯化	选出 3 株高产蛋白酶的菌株，观测了它们形状
实验三	高产蛋白酶菌株的 DNA 提取与测序	鉴定出这 10 株菌全部属于芽孢杆菌属，发现了 1 个潜在新物种菌株 S09-45
实验四	高产蛋白酶的基因扩增与蛋白结构预测	确定这些枯草芽孢杆菌具有水解蛋白能力的蛋白酶 E

(2) 我们从第一次筛选中获得了 70 株具有蛋白酶活性的深海菌株, 再通过优化实验条件, 获得了 10 株蛋白酶活性强的菌株, 它们的水解圈直径与菌落直径的比值范围为 3.57-45。

(3) 通过 16Sr RNA 序列测序得知它们都归属于芽孢杆菌属。同时, 我们对常温条件下生长最迅速的 3 株菌 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 进行了产酶基因扩增与蛋白结构预测, 菌株 XB70-3、XB70-8 和 XB70-9 的蛋白为枯草芽孢杆菌蛋白酶 E, 具有较强的水解蛋白的能力。

(4) 芽孢杆菌属产生在抗逆性强的芽孢以适应残酷、恶劣的环境, 筛选得到了深海来源的高产蛋白酶菌株, 有望通过工程改造与人工选育, 进一步运用于有毒蛋白质降解或难降解角蛋白、几丁质等领域, 或者降解产生功能肽领域, 以应用于医药、解毒、洗涤等人类生活。

六、主要创新点

(1) 使用了稀有独特的实验材料

研究样品采自水深 1700-2800 米的南海深海环境, 目前对具有新代谢机理和生理特性的深海高活性、新颖的产酶微生物优化研究鲜有报道, 样品稀有, 选题新颖独特。

(2) 独创“优中选优”的筛选方法

设计和建立了一种高效实用的寻找功能菌株的快速有效方法, 包括产蛋白酶菌株的寻找, 菌株的纯化和保藏, 产酶活性条件优选以及所获得的菌株的分类鉴定整个流程。

(3) 快速选出高产蛋白酶的菌株

获得了 70 株具有蛋白水解活性、珍贵的深海微生物菌株, 菌株圈径比最高达 84%; 对其中两株圈径比大于 5 的菌株进行了最佳产酶条件优化, 优化后产酶的圈径比提升了 55-63%, 达到了预期的效果, 优化后的菌株具有显著的产酶活性强、生长速度快、易于培养等良好的工业应用前景。

(4) 准确鉴定菌株发现了新物种

鉴定了 10 株高产酶活性的深海微生物的属种信息, 它们都归属于芽孢杆菌属; 对 3 株蛋白酶活性最高的菌株进行蛋白酶基因克隆与蛋白结构预测, 完成系统发育树的构建和显微形态观察, 发现有广阔的应用前景的潜在新物种 S09-45。

(5) 提供应用和结构改造关键信息

对发现的三个菌株的基因组进行系统分析, 发现其产生蛋白酶可能的基因, 设计扩增引物, 扩增出蛋白酶基因序列, 并通过通过 SWISS-MODEL 网站进行比对和蛋白酶结构预测, 成功完成三个菌种蛋白酶结构预测, 为后期蛋白酶水解功能和结构优化打下良好基础。

七、心得与体会

本次课题研究过程中我们深入了解了蛋白酶水解蛋白的机制, 对海洋深海环境中丰富的微生物资源与微生物特性都有了更深刻的认识。我们获得了宝贵的深海沉积物样品, 通过自己动手参与蛋白酶菌株的筛选实验, 掌握了基本的微生物实验操作, 如菌株的接种、鉴定和保藏。同时还进行了部分现代分子生物学实验

和生物信息学研究, 如菌株 DNA 的提取, 琼脂糖电泳和 DNA 序列的分析、数据库比对以及蛋白酶结构预测等。

我们意识到科学实验是一个需要不断探索、不断思考的过程, 我们从感性认识开始, 通过查阅资料, 分析问题, 自己设计实验, 并进行假设和验证实验, 观察和分析结果, 最终收获从发现问题, 到深入的理性认识, 到设计实验解决未知的科学问题的全部过程探索的喜悦与艰辛。我们的动手能力和思维能力都得到了锻炼和提升, 同时培养我们的科研能力并增强深海微生物科学研究产生了浓厚兴趣, 有利于我们今后科研方向规划。

八、思考与展望

本次实验研究的两个深海沉积物样品 16ZBS09、16XB70, 虽然都采集于南海深海, 但深海洋盆环境中的 16XB70 样品比大陆坡环境的 16ZBS09 样品, 直径大于 10mm 水解圈的比率要高, 表明深海洋盆地环境中生物酶资源较丰富。*Bacillus luti* 是 16ZBS09、16XB70 两深海沉积环境共有的菌种, *Bacillus aryabhatai* 是 16ZBS09 环境种特有的蛋白酶活性菌株, 而 *Bacillus altitudinis* 和 *Bacillus xiamenensis* 是 16XB70 中特有的蛋白酶活性菌株。从这些菌株资源的分布情况看, 深海环境存在相同的微生物类群, 但每个样点均显示出其特有的微生物类群, 显示出不同深海环境产酶微生物资源存在较大的差异, 也预示着深海环境产酶微生物的丰富性和多样性。但从生态学角度看, 造成这种群落结构和物种功能差异的原因需今后进行深入研究。

本实验从深海样品采集, 设计产蛋白酶菌株的选择性分离培养基, 最终分离发现了 70 多株高产蛋白酶的菌株, 选择其中产酶活性最好或圈径比最大的 10 株进行了二次产酶活性筛选优化, 最终获得了高产酶活的深海原核微生物菌株, 为后期深入的蛋白酶酶制剂的开发和应用打下了基础。

本实验以脱脂奶粉中蛋白为基础, 进行深海蛋白酶产生菌的培养和筛选, 从透明圈的大小以及透明程度不同, 判断筛选的每种菌株产生的蛋白酶或复合蛋白酶存在一定的差异。因此, 每种菌株通过自身产生并释放到胞外的蛋白酶对脱脂奶粉中蛋白的降解应产生不同的水解产物, 其水解后产物的功效应具有差异, 应该深入的研究, 可应用于蛋白降解产生功能性或药物的功能小分子而应用于临床。

参考文献

- (1) 董瑞兰.菠萝蛋白酶的分离纯化及部分应用性质的研究 [D].福州: 福建农林大学, 2010.
- (2) 侯进慧, 赵明涛.产酸性蛋白酶菌株分子鉴定和酶学性质研究 [J].食品工业科技, 2014, 35 (17): 151-155.
- (3) 王萍.蛋白酶高产海洋酵母的筛选, 发酵条件优化及酶性质的研究[D].青岛: 中国海洋大学, 2006.
- (4) 徐建国, 田呈瑞, 胡青平, 等.高产蛋白酶菌株的筛选及产酶条件优化 [J].中国粮油学报, 2010 (10): 112-115.
- (5) 徐士庆, 胡永飞, 袁爱花, 朱宝利. 深海沉积物微生物元基因组文库来源的新的酯酶基因的张明赞, 王京.微生物蛋白酶的研究进展. 安徽农学通报 [J], 2018, 24 (08) :15-16.
- (6) 克隆、表达及酶学性质.微生物学报 [J] , 2010, 50(7): 891-896.
- (7) Lipp JS, Morono Y, Inagaki F, Hinrichs KU. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. Nature [J], 2008, 454 (7207): 991-994.
- (8) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol [J] , 2013, 30:2725–2729.

致谢

本论文是在尊敬的导师中学生物高级教师、华南师范大学硕士研究生导师宋建陵老师、中国科学院南海海洋研究所博士生导师田新朋研究员的悉心指导下完成的, 实验过程 and 数据分析得到了中国科学院大学、中国科学院南海海洋研究所硕士生何媛秋姐姐的帮助和指导。

在论文实验和完成期间, 无论在文献收集、论文选题、实验设计、实验实施, 还是论文的写作与最后定稿, 都得到了宋建陵老师、田新朋研究员的大量帮助和指导。田老师专业知识全面深厚、思维开阔、着眼科学前沿, 论文撰写过程中给予了很多创新性的想法和指导, 鼓励学生创新思路。宋老师平易近人, 时刻关心和鼓励我们, 常叮嘱我们要注意学习方法和思考, 抓住重点, 培养逻辑思维。宋老师还对全文进行了修改, 使论文得以高质量完成。小何姐姐做事认真, 态度和蔼, 实验严谨, 让我们明白了许多为人处世的道理, 使我们受益匪浅, 终身难忘。

在科研工作中, 三位老师给予我们莫大的鼓励和殷切关怀, 对每一个环节精益求精, 这是我们学习生涯中极大的荣幸。导师们博大精深的学识, 严谨务实的科研态度, 无私奉献科学的精神, 给我们几个学生很大的启迪, 是我们走向科学道路的领路人。

“经师易得, 人师难求”, 再次谨向宋老师、田老师、小何姐姐表示衷心的感谢和崇高的敬意, 感谢你们辛苦的指导 and 帮助。

团队介绍

于镇铨

广州市第六中学高二（2）班学生

学习兴趣浓厚、接受能力较强，成绩优秀。特别喜欢钻研物理、化学、生物科学知识。较善于思考，能通过运用类比及推理等方式，触类旁通，努力找出解决方法。实验动手能力和设计能力较强，在老师指导下，能很快学会仪器设备的使用，在本课题实施过程中，锻炼了实验技能、拓展了科学知识。

在本次科研活动中，是团队负责人，主要负责项目选题、实验设计，参与实验过程，实验数据处理，撰写部分论文。

陈贝琳

广州市第六中学高一（10）班学生

秀气内敛，自信乐观、积极向上，有爱心和奉献精神，刻苦勤奋，遇到问题能积极思考，具有较强的逻辑推理和理解能力。对科技创新、机器人编程有浓厚兴趣，初中阶段在学习之余，积极参加学校或科协组织的科技培训和能力提升活动，获得广东省二等奖1项及广州市一等奖、二等奖2项。

在本次科研活动中，参与项目选题、实验设计和样品准备，重点负责实验三和实验四，对实验数据进行处理和分析，绘制图表，撰写论文一部分。

林子健

广州市第六中学高一（1）班学生

学习成绩优秀，学习能力较强，对科创有浓厚兴趣。能从不同角度剖析事物，善于推理类比。善于使用仪器，能快速进行科学推演，发现实验方案的不足。擅长英文，语言表达能力强，能够研读一部分全英论文。在老师和研究员的帮助下，与同组成员共同完成实验设计，熟悉实验操作，进行了相对完善的科学研究，学会了许多新的知识技能。

在本次科研活动中，参与项目选题、实验设计和仪器调试，重点负责实验二和实验三，对实验数据进行处理和分析，撰写论文一部分。

指导老师

宋建陵

中学生物高级教师, 华南师范大学硕士研究生导师, 广东教育学会科技教育专委会常务理事, 广州市青科教协会创造发明专委会秘书长。广州市优秀教师、广州市六中科技教育首席教师、广州市科技骨干教师培训班导师及班主任。多次评为“十佳优秀科技教师”、“全国优秀园丁”。在国内核心刊物发表生物教学论文 26 篇, 出版专著《中学生物学创新实验》、《高中生物奥赛培训教材》、《青少年发明创新活动指南》、《学习能力与创新思维》、《科普阅读与思维训练》等 8 部。致力于科技创新与学科教学的渗透与整合、特色学校与特色课程的策划与实施、科技创新为高考自主招生服务, 为学校科技创新特色的形成以及评为“全国创新教育十佳学校”做出了贡献。带领团队多次策划和组织了省市科技教育竞赛活动, 均取得圆满成功。

指导学生参加“全国青少年科技创新大赛”、“明天小小科学家奖励活动”获得 68 项省及全国一、二等奖; 2016 年、2017 年指导学生参加过两届“丘成桐中学科学奖”, 获得优胜奖。

田新朋

中国科学院南海海洋研究所研究员, 博士生导师, 现任热带海洋生物资源与生态重点实验室副主任, 南海海洋研究所中科院青促会会长。2006 年至今主要从事海洋微生物(放线菌)资源学、系统学、生态学及其应用研究工作。以第一、二或通讯作者发表学术论文 20 多篇, 参与发表论文 70 多篇, 参与申请发明专利 40 多项(国际专利 5 项), 参编科学专著 5 部, 荣获国家及省级科技奖 5 项。现主持国家基金青年-面上连续资助项目, 面上项目各 1 项, 省部级项目 5 项。Int. J. Syst. Evol. Microbiol、Antonievan Leeuwenhoek 等学术期刊审稿人。主要研究领域: 1) 海洋放线菌资源学、生物学及生态学; 2) 海洋极端环境微生物资源及其开发利用。获奖及荣誉: 1) 广东省特支计划人才入选者(2015); 2) 中国科学院青年创新促进会会员(2015); 3) 国家技术发明二等奖(第五完成人, 2014); 4) 中国专利奖优秀奖(第五完成人, 2013) 5) 广东省科技发明一等奖(第七完成人, 2011); 6) 云南省科学技术奖一等奖(第七完成人, 2008)

学术诚信声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容之外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员：于继强 陈琳 林健

指导老师：李俊 田新朋

2019年9月5日