

枯草芽孢杆菌溶血相关基因 *yqx*C 的表达及功能鉴定

刘 杰,张 琼,房春红

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】确定枯草芽孢杆菌溶血相关基因 *yqx*C 的功能。【方法】采用 PCR 方法,扩增枯草芽孢杆菌溶血相关基因 *yqx*C,构建 GST 融合表达载体,并在大肠杆菌中进行表达。使用含体积分数 5% 绵羊血的琼脂平板,检测可溶性融合蛋白 GST-Yqx 的溶血活性。此外,采用 RT-PCR 检测 *yqx*C 基因在枯草芽孢杆菌中的转录情况。【结果】获得的可溶性融合蛋白 GST-Yqx,在绵羊血琼脂平板上显示出较强的溶血活力;通过 RT-PCR,检测到 *yqx*C 基因可以在枯草芽孢杆菌中转录。【结论】枯草芽孢杆菌 *yqx*C 基因编码蛋白 Yqx 有较强的溶血活性,且能够发生转录,*yqx*C 很可能是引起枯草芽孢杆菌溶血的基因之一。

【关键词】 枯草芽孢杆菌;溶血相关基因;*yqx*C

【中图分类号】 Q939.124.03;Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0145-06

Expression and functional characterization of a hemolysis-associated gene *yqx*C from *Bacillus subtilis*

LIU Jie,ZHANG Qiong,FANG Chun-hong

(College of Life Sciences,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to identify the hemolysis-associated gene *yqx*C from *Bacillus subtilis*. 【Method】 A hemolysis-associated gene *yqx*C was amplified from the genomic DNA of *B. subtilis* by PCR. GST fusion expression vectors were constructed and fusion proteins were expressed in *Escherichia coli*. 5% sheep blood agar plates were used to measure the hemolytic activity of the expressed soluble fusion protein. In addition, the transcription of *yqx*C was studied by RT-PCR. 【Result】 The soluble fusion protein GST-Yqx showed strong hemolytic activity on sheep blood agar plates and *yqx*C was indeed transcribed in *B. subtilis*. 【Conclusion】 Yqx encoded by *yqx*C in *B. subtilis* had the strong hemolytic activity and *yqx*C was transcribed in *B. subtilis*. Therefore we inferred that *yqx*C is possibly one of the hemolysin genes responsible for hemolysis in *B. subtilis*.

Key words: *Bacillus subtilis*; hemolysis-associated gene;*yqx*C

作为一种益生菌,枯草芽孢杆菌在工农业生产^[1-2]、食品保藏^[3]、医疗卫生^[4-5]等方面具有非常广泛的应用。然而,近年来的一些研究报道表明,枯草芽孢杆菌的部分代谢物能够引起溶血^[6-9]。菌株的致病性与其溶血活力密切相关,因为溶血素已经被看作致病的重要毒力因子,如金黄色葡萄球菌 α 溶血素^[10]、链球菌素 O^[11] 和副溶血性弧菌直接相关毒

素^[12],都是该菌致病的主要毒力因子,能够引起多种人类疾病。随着枯草芽孢杆菌的广泛应用,其与人们生产生活的关系也日益密切,因此,对人类健康的威胁也随之增加。然而,关于枯草芽孢杆菌的溶血素基因及其溶血机理目前尚不清楚。

迄今,枯草芽孢杆菌 168 的全基因组测序工作已经完成,从对该基因组的注释中,发现了 8 个与溶

* [收稿日期] 2010-07-28

[基金项目] 西北农林科技大学人才专项(Z111020825);西北农林科技大学博士后科研项目(K308020901)

[作者简介] 刘 杰(1979—),男,黑龙江大庆人,讲师,博士,主要从事微生物分子生物学研究。E-mail:liujie2003@hotmail.com

血相关的基因,分别为 *yhdP*、*yhdT*、*yugS*、*yrkA*、*yqhB*、*yqx*C、*yplQ* 和 *ytjA*^[13]。除 *ytjA* 被鉴定为枯草芽孢杆菌的溶血素基因外^[9],其他 7 个基因的功能还一直未被鉴定。因此,研究它们的功能,确定其与溶血发生的相关性,是揭示枯草芽孢杆菌溶血机理的前提和基础。为此,本研究克隆并表达了枯草芽孢杆菌的溶血相关基因 *yqx*C,同时检测了表达产物的溶血活性及 *yqx*C 的转录情况,以期为进一步研究枯草芽孢杆菌的溶血机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

枯草芽孢杆菌 224 由哈尔滨白天鹅药业提供;菌株 *E. coli* JM109、BL21 (DE3) *plysS*、原核表达载体 pGEX-4T-1,由陕西省农业分子生物学重点实验室保存;克隆载体 pMD18-T simple 购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂

凝胶回收试剂盒,OMEGA 公司产品;质粒小量提取试剂盒、限制性内切酶、*Ex Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、IPTG 和氨苄青霉素,均购自 TaKaRa 公司;抗 GST(谷胱甘肽-S 转移酶)标签鼠单克隆抗体和羊抗小鼠 IgG-HRP(辣根过氧化物酶),均购自北京康为世纪生物技术有限公司;引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.3 YqxC 的生物信息学分析

首先利用 ProtParam 软件 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)分析蛋白质的理化性质,如等电点、不稳定系数等;然后利用 Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)对蛋白质 YqxC 的结构域进行分析;最后利用 BLASTP (NCBI)从 non-redundant databases 中获得同源蛋白,并通过 ClustalX (1.8)软件进行序列多重比较。

1.4 yqxC 基因的克隆

以枯草芽孢杆菌 224 基因组 DNA 为模板,基因组 DNA 的提取参照文献[14]的方法进行。根据基因序列设计扩增 *yqx*C 基因全长的 PCR 引物,并在上游引物 5'端引入 *Bam*H I 位点(下划线部分),下游引物 5'端引入 *Sal* I 位点(下划线部分)。序列为:上游引物 5'-TC GGATCCATGACGTCAAAG-AAAGAAC-3';下游引物 5'-CTGTCGACTTAT-TCCGGTACATC TGC-3'。PCR 反应体系(25 μ L)为:模板(200 ng/ μ L) 2.0 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 3.5 μ L, 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer 2.5 μ L, *Ex Taq* 酶 (5 U/ μ L) 1.0 μ L, 上、下游引物 (10

pmol/ μ L) 各 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,产物经胶回收试剂盒回收纯化后连入克隆载体 pMD18-T simple,然后转化入大肠杆菌 JM109,氨苄青霉素抗性平板筛选,阳性克隆经菌落 PCR 及重组质粒 pMD18-T simple-*yqx*C 的双酶切鉴定后,送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.5 yqxC 基因的原核表达及 SDS-PAGE 分析

以 *Bam*H I 和 *Sal* I,对载体 pGEX-4T-1 和经测序正确的重组质粒 pMD18-T simple-*yqx*C 双酶切;电泳,回收纯化酶切产物,以 T4 DNA 连接酶连接成重组质粒后,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞;重组子经酶切鉴定正确后,转化表达宿主菌 BL21(DE3)*plysS*。用 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mmol/L 的 IPTG 分别在 37, 28, 18 $^{\circ}$ C 进行诱导表达,同时设空质粒菌和未诱导对照。将诱导后的含重组质粒 pGEX-4T-1-*yqx*C 的 BL21(DE3)*plysS* 以 12 000 r/min 离心 10 min, PBS(磷酸缓冲液, pH 8.0)重悬,冰上超声裂解菌体。产物于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min;分别收集上清和包涵体沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6 yqxC 基因可溶性表达产物的 Western blot 鉴定

将电泳产物电转移至硝酸纤维素膜,以体积分数 10%脱脂奶封闭 1 h;用经体积分数 2%脱脂奶稀释(1:500)的抗 GST 标签鼠单克隆抗体室温孵育 2 h 洗涤,加入经体积分数 2%脱脂奶稀释(1:500)的羊抗小鼠 IgG-HRP 孵育 1 h;再洗涤后加入二氨基联苯胺(DAB)底物液和酶显色剂;在暗室中将硝酸纤维素膜上相应的条带曝光在胶片上。

1.7 融合蛋白的溶血活性检测

将获得的融合蛋白 GST-YqxC 经透析袋浓缩至总蛋白质量浓度达 50 mg/mL 后,滴加至已打孔的含体积分数 5%绵羊血的琼脂平板小孔内,37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后观察结果。以鞘磷脂酶 C(50 mg/mL)为阳性对照,以含空质粒 pGEX-4T-1 的 BL21(DE3) *plysS* 裂解物上清为阴性对照。

1.8 yqxC 在枯草芽孢杆菌 224 中转录的 RT-PCR 检测

以 TRIzol reagent 提取菌体总 RNA,然后将总 RNA 通过 cDNA Synthesis Kit 逆转录成 cDNA。根据 *yqx*C 基因设计 RT-PCR 引物,上游引物 5'-TATTAGTGGAAAGAGGGCT-3',下游引物 5'-

个氨基酸组成,分子质量 31.27 ku,理论等电点 8.28,属于稳定蛋白;Pfam 预测结果显示,Yqx C 从第 6 至 51 位氨基酸为 S4 结构域,第 62 至 245 位氨基酸为 FtsJ 结构域。经 BLASTP 软件相似性搜索发现,枯草芽孢杆菌 *yqx C* 基因编码产物与短小芽孢杆菌 ATCC 7061 的溶血素 A 有 76%的一致性和 86%的相似性,与来自蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579 的溶血素 A 有 71%的一致性和 84%的相似性,与来自炭疽芽孢杆菌 str. Ames 的溶血素 A 达到 70%的一致性和 84%的相似性,与苏云金芽孢杆菌 serovar konkukian str. 97-27 的溶血素 A 也有 70%的一致性和 83%的相似性。用 ClustalX 对这 5 个蛋白一级结构的比较结果见图 1。

2.1 Y_{qx}C 的生物信息学分析

枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis	MSAKKERVDLLVERGLIETREKAKRIMAGLVYANEMRLDKPGEKIPHD
短小芽孢杆菌	Bacillus pumilus	MSAKKERVDLLVERGLIETREKAKRIMAGLVYANEMRLDKPGEKIPQD
蜡样芽孢杆菌	Bacillus cereus	MSVKKERVDVLLVERGLIETREKAKRIMAGLVYANEMRLDKPGEKISQD
苏云金芽孢杆菌	Bacillus thuringiensis	MTSKKERLDVLLVERGLAETREKAKRIMAGIVYSNENRLDKPGEKIDRD
炭疽芽孢杆菌	Bacillus anthracis	MTSKKERLDVLLVEQGMLTETREKAKRIMAGIVYSNENRLDKPGEKIARD *: ***: *****: *# *****: *: *# ***** : *
枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis	TEITVKGVMPYVSRRGGYKLEKALETFLHDLQDKVMIDIGSSTGGFTDCA
短小芽孢杆菌	Bacillus pumilus	TEITVKGVMPYVSRRGGYKLEKALETFLHDLQDKVMIDIGSSTGGFTDCA
蜡样芽孢杆菌	Bacillus cereus	TEITVKGVMPYVSRRGGYKLEKALETFLHDLQDKVMIDIGSSTGGFTDCA
苏云金芽孢杆菌	Bacillus thuringiensis	LPLTVKGNPLRVYSRGGKLKEALKEFPYSVKDDLMIDIGSSTGGFTDCA
炭疽芽孢杆菌	Bacillus anthracis	TPLTVKGNPLKYVSRRGGLKLEALKEFDLTVEGKLLIDIGSSTGGFTDCA :****: : ***** *****: * : .:.*:;*****
枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis	LQNGAKLSYALDVGNQLAWLKRQDERVVMMERTNFRTVPADLERGLPQ
短小芽孢杆菌	Bacillus pumilus	LQNGAKLSYALDVGNQLAWLKRQDERVVMMERTNFRTVPADLERGLPQ
蜡样芽孢杆菌	Bacillus cereus	LQNGAKLSYALDVGNQLAWLKRQDERVVMMERTNFRTVPADLERGLPQ
苏云金芽孢杆菌	Bacillus thuringiensis	LQNGAKQSAYADVGNQLAWLKRQDERVVMMERTNFRTVPADFTKGMPPE
炭疽芽孢杆菌	Bacillus anthracis	LQNGAVKSAYADVGNQLAWLKRQDDRIVMERTNFRHSVPADFDTGLPE ***** **: *****: *: *****: . ***: *: *
枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis	FASIDVSFISLKLILPVLKTMLMPNGDVAALIKPFQFEAGREGVGKKGIVR
短小芽孢杆菌	Bacillus pumilus	FASIDVSFISLKLILPVLKTMLMPNGDVAALIKPFQFEAGREGVGKKGIVR
蜡样芽孢杆菌	Bacillus cereus	FASIDVSFISLKLILPVLKTMLMPNGDVAALIKPFQFEAGREGVGKKGIVR
苏云金芽孢杆菌	Bacillus thuringiensis	FATIDVSFISLRLLPVLRTLTPGSDCMALVKPQFEAGRESVGKKGIVR
炭疽芽孢杆菌	Bacillus anthracis	VASIDVSFISLKLILPALKHILVPGGDIALVKPQFEAGRELVGKKGIVR . *: *****: *****: *: :*:.* ***: ***** *****
枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis	DRKVHEAVVEMIVDFAIKEGYDVEGLTFSPITGGDGNIEFLIHLKWHGER
短小芽孢杆菌	Bacillus pumilus	DRKVHEAVVEMIVDFAIKEGYDVEGLTFSPITGGDGNIEFLIHLKWHGER
蜡样芽孢杆菌	Bacillus cereus	DRKVHEAVVEMIVEFALKEGYDVEGLTFSPITGGDGNIEFLIHLKWHGER
苏云金芽孢杆菌	Bacillus thuringiensis	DPKVHADVLKRMISFSAAEGYICKGLSFSPITGGDGNIEFLHLHPWPEG
炭疽芽孢杆菌	Bacillus anthracis	EPSVHLGVLEEMNEFAAKEGYDVKDSFSPITGGDGNIEFLHLKLPDQ : . ***: *:: : *. ***: .: : *****: *****: ***** :
枯草芽孢杆菌	Bacillus subtilis	ENGHNHSPSVSEQVVTAEHDVLKQKGKGE-----
短小芽孢杆菌	Bacillus pumilus	ENGHNHSPSVSEQVVTAEHDVLKQKGKGE-----
蜡样芽孢杆菌	Bacillus cereus	ENGHNHSPSIEIQVVTAEHVLKQKGKGE-----
苏云金芽孢杆菌	Bacillus thuringiensis	QEQQELPEEII MRVVEEAH-----
炭疽芽孢杆菌	Bacillus anthracis	EENEALPVSELEIKVKEASHILKEKKNSPEPADT : : : : : * ***

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of *B. subtilis* 224 YqxC with other four bacterial hemolysins. Identical, highly similar and similar amino acids have been indicated by “*”, “:” and “.”, respectively.

2.2 *yqx*C 基因的 PCR 扩增及重组质粒的鉴定

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后显示,其长度为 846 bp,与预期大小相符(图 2)。重组质粒 pMD18-T simple-*yqx*C 经 *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切后,电泳结果显示,出现了 2 692 bp 的 pMD18-T simple 条带和 846 bp 的 *yqx*C 基因条带(图 3);重组质粒测序结果表明,*yqx*C 基因序列与 GenBank 上报道的完全一致(登录号为 AL009126)。

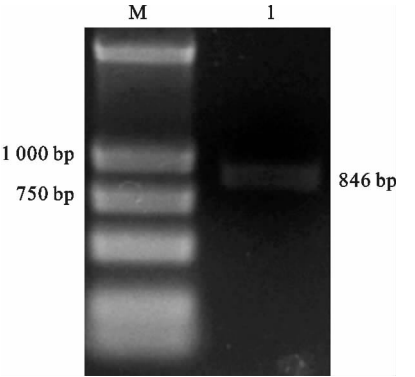


图 2 枯草芽孢杆菌 224 *yqx*C 基因的 PCR 扩增结果
M. DL2000 DNA Marker;1. *yqx*C 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR amplification of the *yqx*C gene
from *B. subtilis* 224

M. DL2000 DNA Marker;1. PCR amplified
fragments of the *yqx*C gene

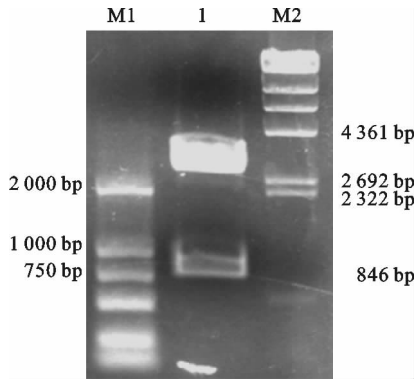


图 3 重组质粒 pMD18-T simple-*yqx*C 的
双酶切鉴定结果

M1. DL2000 DNA Marker;M2. λ -Hind III digest DNA Marker;
1. pMD18-T simple-*yqx*C 的 *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切结果

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pMD18-T
simple-*yqx*C by double restriction digestion

M1. DL2000 DNA Marker;M2. λ -Hind III digest DNA Marker;
1. pMD18-T simple-*yqx*C digested with the restriction
enzymes *Bam*H I and *Sal*I

2.3 *yqx*C 基因表达产物的可溶性鉴定

试验结果表明,当 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L、温度为 18℃ 时,诱导的融合蛋白 GST-

YqxC (57 ku) 能够以可溶性形式表达,且表达量最高(图 4)。Western blot 结果进一步证实,YqxC 融合蛋白在此条件下能以可溶性形式表达(图 5)。

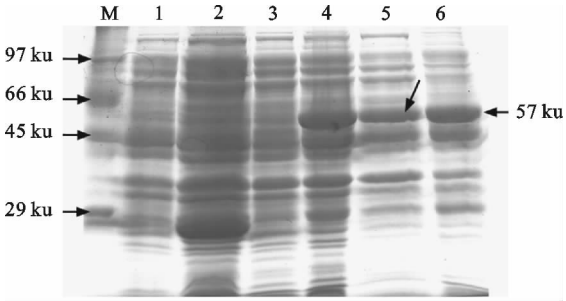


图 4 融合蛋白 GST-YqxC 的 SDS-PAGE 分析
M. 低分子质量蛋白 Marker;1. 未经诱导的 pGEX-4T-1;
2. IPTG 诱导的 pGEX-4T-1;3. 未经诱导的 pGEX-4T-1-*yqx*C;
4. IPTG 诱导的总蛋白;5. IPTG 诱导后的上清液;
6. IPTG 诱导后的沉淀

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the fusion protein GST-YqxC

M. Low molecular weight Marker;
1. Uninduced cell lysates of pGEX-4T-1-harboring *E. coli*;
2. IPTG-induced cell lysates of pGEX-4T-1-harboring *E. coli*;
3. Uninduced cell lysates of pGEX-4T-1-*yqx*C-harboring *E. coli*;
4-6. IPTG-treated cell lysates of pGEX-4T-1-*yqx*C-harboring *E. coli*. 4,5, and 6 indicate whole-cell lysates, soluble fractions, and insoluble fractions, respectively

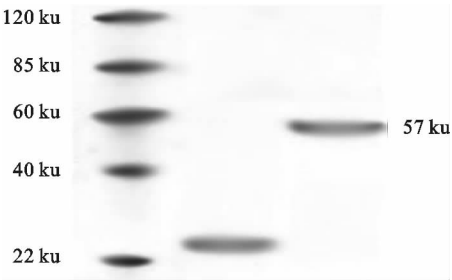


图 5 可溶性表达的融合蛋白 GST-YqxC 的
Western blot 分析

M. 预染蛋白 Marker;1. IPTG 诱导的 pGEX-4T-1;
2. IPTG 诱导的 pGEX-4T-1-*yqx*C 细胞裂解物上清液

Fig. 5 Western blot analysis of the soluble
fusion protein GST-YqxC

M. Prestained protein Marker;
1. IPTG-induced cell lysates of pGEX-4T-1-harboring *E. coli*;
2. Soluble fractions of IPTG-treated cell lysates of
pGEX-4T-1-*yqx*C-harboring *E. coli*

2.4 融合蛋白的溶血活性检测

对含有重组质粒 pGEX-4T-1-*yqx*C 及空质粒 pGEX-4T-1 的 BL21(DE3)plysS 进行超声破碎,离心取上清液浓缩,将浓缩产物滴入已打孔的含体积分数 5%绵羊红细胞的血平板小孔中,37℃ 培养 16

h,4℃放置 30 min 后观察发现,阳性对照鞘磷脂酶 C 及 *yqxC* 小孔周围有明显的溶血环出现,而空质粒 pGEX-4T-1 小孔周围无变化(图 6)。

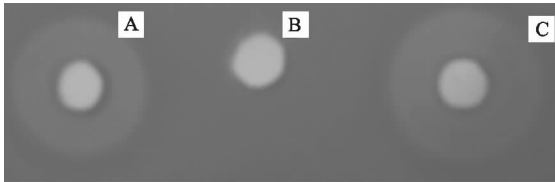


图 6 融合蛋白 GST-YqxC 的溶血活性检测
A. IPTG 诱导的 pGEX-4T-1-*yqxC* 细胞裂解物;
B. IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 细胞裂解物(阴性对照);
C. 鞘磷脂酶 C(阳性对照)
Fig. 6 Detection of hemolytic activity of the fusion protein GST-YqxC
A. Lysates of IPTG-induced *E. coli* BL21 cells harboring pGEX-4T-1-*yqxC*; B. Lysates of IPTG-induced *E. coli* BL21 cells harboring pGEX-4T-1(negative control);
C. Sphingomyelinase C(positive control)

2.5 *yqxC* 在枯草芽孢杆菌 224 中的转录分析

采用 RT-PCR,以特异性引物在枯草芽孢杆菌 224 总 RNA 逆转录所得的 cDNA 作为模板,特异性地扩增出了 *yqxC* 的片段(728 bp);以逆转录前的总 RNA 代替 cDNA 作为模板,没有扩增产物出现(图 7),从而排除逆转录前样品中存在基因组 DNA 污染的可能,测序结果与 *yqxC* 序列完全一致。

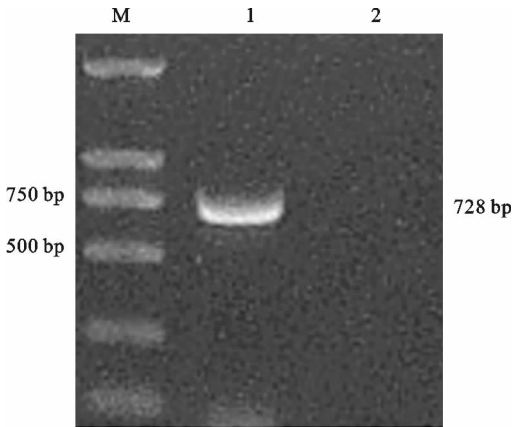


图 7 *yqxC* 在枯草芽孢杆菌 224 中转录的 RT-PCR 检测
M. DL2000 DNA Marker;1. 枯草芽孢杆菌 224 *yqxC* 基因的 RT-PCR 扩增产物;2. 用枯草芽孢杆菌 224 总 RNA 为模板扩增 *yqxC* 基因(阴性对照)
Fig. 7 Transcription analysis of *yqxC* in *B. subtilis* 224 by RT-PCR

M. DL2000 DNA Marker;1. RT-PCR-amplified fragments of the *yqxC* gene from *B. subtilis* 224;2. Results of the PCR amplification of the *yqxC* gene from *B. subtilis* 224 by using the total RNA sample directly as the template (negative control)

3 讨 论

溶血素是一大类由病原生物产生的能导致红细胞裂解的毒素蛋白的总称。根据溶血素的结构、与细胞的结合方式、孔道形成机制和引起靶细胞反应的不同,将溶血素主要分为重复子毒素家族(Repeats in toxin family, RTX)和硫醇活性胆固醇结合细胞溶素家族(Family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysin) 2 个大家族。本研究采用 Pfam 软件,对 *yqxC* 基因编码的蛋白二级结构进行了预测,结果显示,其具有 FtsJ 及 S4 结构域。这 2 种结构域在某些 rRNA 甲基转移酶中存在,而在某些非磷脂酶类溶血素基因(如 *tlyA*)编码的蛋白中,同样也存在 FtsJ 及 S4 结构域。目前,已证实 *tlyA* 基因编码的产物为溶血素,能导致红细胞的裂解^[15-16]。因此,可推断 YqxC 蛋白属于溶血素家族。

本试验通过构建原核表达载体,成功克隆表达了 N 端带有 GST 标记的融合蛋白 GST-YqxC。由于需要验证融合蛋白的功能,因此本研究通过对表达条件的优化,使得蛋白尽可能多地以具有正确空间折叠构象的可溶性形式表达。可溶性融合蛋白 GST-YqxC 在绵羊血琼脂平板上显示出较强的溶血活力,这表明 *yqxC* 基因可能与枯草芽孢杆菌引起的一系列疾病有关,如败血症^[17]、菌血症^[18]等。

在本研究中,RT-PCR 结果证实了 *yqxC* 基因在枯草芽孢杆菌中发生转录,但其是否真正翻译成有溶血活性的蛋白尚不能确定,因此,下一步工作需制备 YqxC 蛋白的多克隆抗体,以确定其在枯草芽孢杆菌的培养物中是否存在;另外,还需构建带有报告基因的转录融合表达载体,以确定 *yqxC* 基因在枯草芽孢杆菌中转录的强弱,以便从不同层面上证实 *yqxC* 基因与枯草芽孢杆菌溶血的相关性。

总之,本研究证实了 *yqxC* 基因编码蛋白有较强的溶血活性,而且确定其在枯草芽孢杆菌中发生转录,这些工作为进一步研究 *yqxC* 基因与枯草芽孢杆菌溶血的相关性及溶血的分子机理奠定了基础。

[参考文献]

[1] Swain M R, Ray R C. Alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* CM3 in solid state fermentation using cassava fibrous residue [J]. J Basic Microbiol, 2007, 47(5): 513-517.
[2] Deepak V, Kalishwaralal K, Ramkumarpanid S, et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology [J]. Biore-sour Technol, 2008, 99(17): 8170-8174.

[3] Heinzmann S,Entian K D,Stein T. Engineering *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for improved production of the lantibiotic subtilin [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2006,69(5):532-536.

[4] 彭文要,谢举临. 白天鹅气雾剂对Ⅱ°烧伤创面愈合的作用 [J]. 青海医药杂志,2002,32(2):5-6.
Peng W Y,Xie J L. Effect of *Bacillus subtilis* viable-preparation for second-degree burn wound healing [J]. Qinghai Med J,2002,32(2):5-6. (in Chinese)

[5] 王万东,高庆祥,何士平. 白天鹅气雾剂治疗面、颈深Ⅱ度烧伤疗效观察 [J]. 宁夏医学院学报,2002,24(5):363-364.
Wang W D,Gao Q X,He S P. Observation of curative effect of *Bacillus subtilis* viable preparation for second-degree burn in the face and neck [J]. J Ningxia Med Coll,2002,24(5):363-364. (in Chinese)

[6] Hofemeister J,Conrad B,Adler B,et al. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide-and polyketide-like antibiotics,iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3 [J]. Mol Genet Genomics,2004,272(4):363-378.

[7] Liu J,Fang C,Jiang Y,et al. Characterization of a hemolysin gene *ytjA* from *Bacillus subtilis* [J]. Curr Microbiol,2009,58(6):642-647.

[8] Monteiro L,Mariano R L R,Souto-Maior A M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* [J]. Braz Arch Boil Technol,2005,48(1):23-29.

[9] Dehghan-Noude G,Housaindokht M,Bazzaz B S. Isolation, characterization,and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [J]. J Microbiol,2005,43(3):272-276.

[10] Phillips J R,Tripp T J,Regelmann W E,et al. Staphylococcal alpha-toxin causes increased tracheal epithelial permeability [J]. Pediatr Pulmonol,2006,41(12):1146-1152.

[11] Kehoe M A,Miller L,Walker J A,et al. Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene:Structural homologies between SLO and other membrane-damaging thiol-activated toxins [J]. Infect Immun,1987,55(12):3228-3232.

[12] Chiang M L,Chou C C. Expression of superoxide dismutase,catalase and thermostable direct hemolysin by,and growth in the presence of various nitrogen and carbon sources of heat-shocked and ethanol-shocked *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Int J Food Microbiol,2008,121(3):268-274.

[13] Kunst F,Ogasawara N,Moszer I,et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Nature,1997,390(20):249-256.

[14] 刘刚,翟朝阳. 一种通用的从少量培养液中快速提取细菌染色体 DNA 的方法 [J]. 西部医学,2004,16(2):111-113.
Liu G,Zhai C Y. A current and speedy extraction method for bacterial chromosomal DNA from a trifle of broth [J]. Med J West China,2004,16(2):111-113. (in Chinese)

[15] Martino M C,Stabler R A,Zhang Z W,et al. Helicobacter pylori pore-forming cytolysin orthologue *tlyA* possesses *in vitro* hemolytic activity and has a role in colonization of the gastric mucosa [J]. Infect Immun,2001,69(3):1697-1703.

[16] 钟怡,董珂,杨杨,等. 双曲钩端螺旋体溶血素基因 *tlyA* 的克隆、表达及初步功能鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(8):739-744.
Zhong Y,Dong K,Yang Y,et al. Cloning,expression and preliminary characterization of a hemolysin gene *tlyA* from *Lep-tospira biflexa* serovar Patoc [J]. Chinese Journal of Zoonoses,2007,23(8):739-744. (in Chinese)

[17] Matsumoto S,Suenaga H,Naito K,et al. Management of suspected nosocomial infection: An audit of 19 hospitalized patients with septicemia caused by *Bacillus species* [J]. JPN J Infect Dis,2000,53(5):196-202.

[18] Galanos J,Perera S,Smith H,et al. Bacteremia due to three *Bacillus species* in a case of Munchausen's syndrome [J]. J Clin Microbiol,2003,41(5):2247-2248.

(上接第 144 页)

[18] 陈义光. 新型物理诱变方法及其在微生物诱变育种中的应用进展 [J]. 长江大学学报:自然科学版,2005,2(5):46-48.
Chen Y G. The advances of new physical mutagenesis in microorganism breeding [J]. Journal of Yangtze University: Natural Science Edition,2005,2(5):46-48. (in Chinese)

[19] 汪杏莉,李宗伟,陈林海,等. 工业微生物物理诱变育种技术的新进展 [J]. 生物技术通报,2007,18(2):114-117.
Wang X L,Li Z W,Chen L H,et al. The development of physical mutagenesis technology in industry microorganism [J]. Biotechnology Bulletin,2007,18(2):114-117. (in Chinese)

[20] 王海磊,李宗义. 三种重要木质素降解酶研究进展 [J]. 生物学杂志,2003,20(5):9-12.
Wang H L,Li Z Y. Three important enzymes for lignin degradation [J]. Biotechnology Journal,2003,20(5):9-12. (in Chinese)