



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110257269 A

(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201810202641.3

A23L 3/3526(2006.01)

(22)申请日 2018.03.12

A61K 38/16(2006.01)

(83)生物保藏信息

A61K 8/64(2006.01)

CCTCC M 2018074 2018.01.24

A61P 31/04(2006.01)

(71)申请人 屏東科技大学

A61Q 17/00(2006.01)

地址 中国台湾屏东县

C12R 1/01(2006.01)

(72)发明人 胡绍扬

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C07K 14/195(2006.01)

A23K 50/80(2016.01)

A23K 10/18(2016.01)

权利要求书1页 说明书18页

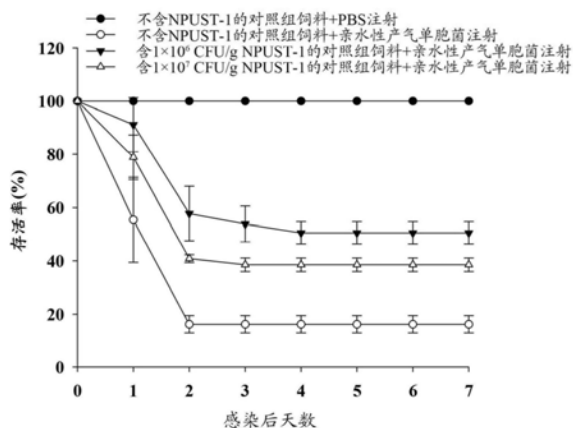
序列表1页 附图17页

(54)发明名称

一种产细菌素的类芽孢杆菌及其应用

(57)摘要

本发明提供一种产细菌素的爱媛类芽孢杆菌菌株NPUST-1,其可促进水产养殖生物的成长及免疫反应。同时,该菌株还可提升水产养殖生物感染病原菌后的存活率。此外,该爱媛类芽孢杆菌菌株NPUST-1所产细菌素Peocin是饥饿/停滞期DNA保护蛋白,对包含养殖病原菌、食源性病原菌及临床性病原菌的多种病菌具抗菌活性。该细菌素Peocin是首次发现具抗菌活性的饥饿/停滞期DNA蛋白。



1. 一种类芽孢杆菌菌株NPUST-1,经鉴定为爱媛类芽孢杆菌菌株 (*Paenibacillus ehimensis*),其保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏编号为CCTCC M 2018074。
2. 如权利要求1所述的类芽孢杆菌菌株,其中,所述菌株可促进水产养殖生物的成长及免疫反应。
3. 一种权利要求1所述的菌株用于作为益生菌喂食水产养殖生物用途。
4. 一种细菌素蛋白,其特征在于,其为类芽孢杆菌菌株 (保藏编号为CCTCC M 2018074) 所生产的饥饿/停滞期DNA保护蛋白,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1。
5. 如权利要求4所述的细菌素蛋白,其中,所述细菌素蛋白表现有对于养殖病原菌、食源性病原菌及临床性病原菌的抗菌活性。
6. 权利要求5所述的细菌素蛋白,其中,所述养殖病原菌、食源性病原菌及临床性病原菌包含:亲水性产气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、酵母菌 (*Debaryomyces hansenii*)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*;MRSA)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、伯克霍尔德菌 (*Burkholderia gladioli*)。
7. 一种权利要求4所述的细菌素蛋白用于作为食品或化妆品中的天然抗菌剂的用途。
8. 一种权利要求4所述的细菌素蛋白用于制造替代抗生素治疗具抗药性病原菌的感染的蛋白药物的用途。
9. 一种水产养殖生物饲料,其特征在于,其饲料配方含有权利要求1所述的类芽孢杆菌菌株。
10. 如权利要求9所述的水产养殖生物饲料,其中,其用于增加水产养殖生物感染亲水性产气单胞菌后的存活率。

一种产细菌素的类芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 水产养殖生物在养殖过程中,由于多为集约式养殖,病原菌的感染容易迅速传播使养殖生物大量死亡,造成巨大的经济损失。因此,疾病问题是阻碍水产养殖产业发展的严重问题。面对疾病问题,目前市面上主要是应用抗生素或化学药剂进行预防或治疗处理,然而,化学药剂对非标的生物也具有毒性,连续使用容易危害人体或造成环境污染。同时,抗生素的滥用则会导致病原菌抗药性的产生,造成生态环境的破坏。因此,近年来,基于食用安全与环境永续发展的观点,水产养殖业对生物性防治法的需求日渐增加。

背景技术

[0002] 生物防治法中,使用从自然界分离的益生菌,对环境影响较小且可减少抗药性菌产生的风险,是替代抗生素预防疾病的有效策略之一。其中,爱媛类芽孢杆菌(*Paenibacillus ehimensis*)已被应用于经济作物中作为益生菌,例如,用于防治番茄中的根结线虫病(Hong,Anees,&Kim, 2013)以及镰刀菌枯萎病;用于防治辣椒中的辣椒疫病菌*Phytophthora capsici*等。然而,由于水产养殖生物的生存环境与上述经济作物相比,具有水质、酸碱度、盐分以及共生的微生物等更复杂的环境因素,在水产养殖领域中,尚未有任何应用爱媛类芽孢杆菌作为益生菌的专利或研究被披露。

[0003] 作为益生菌的细菌所产生的抗菌物质通称为细菌素(Bacteriocin),与其他化学合成的抗菌添加物及抗生素相比,细菌素主要为核糖体合成的蛋白质或是小分子肽,通常对人体和环境无害,因此可进一步应用于食品产业与临床医药,取代抗生素等作为抗菌物质。目前已鉴定出的爱媛类芽孢杆菌所产的细菌素,可列举例如:由*P. ehimensis* B7 菌株中鉴定出的PE1与PE2,此两个环状脂肽(Cyclic lipopeptide)对临床上具抗药性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*;MRSA)、大肠杆菌(*E. coli*)与绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)具有抗菌效果(Z.Huang et al.,2013);由*P. ehimensis* MA2012菌株中鉴定出的细菌素polypeptin C,其对植物性真菌与细菌性病源菌有抑制效果(Kyaw Wai Naing et al.,2015)。然而,尚未有应用爱媛类芽孢杆菌所产的细菌素在水产养殖领域的专利或研究被披露。

[0004] 此外,过去对于水产养殖生物的益生菌应用的研究,主要是探讨益生菌促进水产养殖生物生长以及疾病保护能力,但近年来,益生菌对于水产养殖生物的免疫调节作用逐渐被关注。多种益生菌提升水产养殖生物免疫反应的效果已被披露,例如可列举:*Clostridium butyricum*能够提升鳊(*Miichthys miiuy*)的溶菌酶、吞噬活性以及免疫球蛋白表达,以及鳊感染*Vibrio anguillarum*后的存活率(Pan et al., 2008);*Kocuria species*能够提升虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的溶菌酶、吞噬活性以及免疫球蛋白表达,以及虹鳟感染*Vibrio anguillarum*后的存活率(Sharifuzzaman&Austin,2009)等。

[0005] 非专利文献

[0006] 1.Hong,S.H.,Anees,M.,&Kim,K.Y.(2013).Biocontrol of *Meloidogyne incognita* inciting disease in tomato by using a mixed compost inoculated with

Paenibacillus ehimensis RS820. *Biocontrol Science and Technology*, 23 (9), 1024-1039.

[0007] 2. Huang, Z., Hu, Y., Shou, L., & Song, M. (2013). Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus ehimensis* B7. *BMC Microbiology*, 13 (1), 87.

[0008] 3. Pan, X., Wu, T., Song, Z., Tang, H., & Zhao, Z. (2008). Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyrium* CB2. *Journal of Fish Diseases*, 31 (9), 679-686.

[0009] 4. Sharifuzzaman, S. M., & Austin, B. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 27 (3), 440-445.

发明内容

[0010] 发明所要解决的技术问题

[0011] 综上所述,在水产养殖领域中,对可替代抗生素与化学药剂的产细菌素的益生菌的研发必然有需求。同时,考虑到研发需要花费大量时间与金钱成本,也期望所研发的益生菌生产的细菌素可对多种病原菌具有抗菌活性,或是该益生菌具有提升水产养殖生物免疫反应的功 效,可凭借这些优势广泛应用于多种病害的防治。进一步地,为追求 产量提升,也期望该益生菌兼具促进养殖生物成长的功效。

[0012] 因此,本发明的目的在于,提供一种可应用于水产养殖领域的产细菌素的益生菌,其不仅可作为提升水产养殖生物免疫反应的益生菌,同时,该益生菌所产细菌素,可对多种病原菌具有抗菌活性。此外,该益生菌,还具有促进养殖生物成长的功效。

[0013] 技术手段

[0014] 本发明者为了解决所述课题而深入研究,通过自吴郭鱼养殖池中 筛选出产细菌素的爱媛类芽孢杆菌菌株NPUST-1,进一步将所产细菌素Peocin纯化及分析,并分析喂食该爱媛类芽孢杆菌菌株NPUST-1 的斑马鱼以及吴郭鱼的免疫反应,从而获得一种产细菌素的爱媛类芽孢杆菌菌株NPUST-1,其可促进水产养殖生物的成长及免疫反应。同时,该菌株还可提升水产养殖生物感染病原菌后的存活率。

[0015] 此外,该爱媛类芽孢杆菌菌株NPUST-1所产细菌素Peocin,是饥饿/停滞期DNA保护蛋白,对包含养殖病原菌、食源性病原菌及临床 性病原菌的多种病菌具抗菌活性。该细菌素Peocin是首次发现具抗菌活性的饥饿/停滞期DNA蛋白。

[0016] 因此,本发明提供以下技术方案:

[0017] (1) 一种类芽孢杆菌菌株NPUST-1,经鉴定为爱媛类芽孢杆菌 菌株(*Paenibacillus ehimensis*),其保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称CCTCC,地址为武汉市武昌珞珈山),保藏日期为2018年1月24日,保藏编号为CCTCC M 2018074。

[0018] (2) 如方案1所述的类芽孢杆菌菌株,其中,所述菌株可促进水 产养殖生物的成长及免疫反应。

- [0019] (3) 一种方案1所述的菌株用于作为益生菌喂食水产养殖生物的使用。
- [0020] (4) 一种细菌素蛋白,其特征在于,其为类芽孢杆菌菌株(保藏 编号为CCTCC M 2018074)所生产的饥饿/停滞期DNA保护蛋白,其 具有氨基酸序列SEQ ID NO:1。
- [0021] (5) 如方案4所述的细菌素蛋白,其中,所述细菌素蛋白表现有 对于养殖病原菌、食源性病原菌及临床性病原菌的抗菌活性。
- [0022] (6) 如方案5所述的细菌素蛋白,其中,所述养殖病原菌、食源 性病原菌及临床性病原菌包含:亲水性产气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、酵母菌(*Debaryomyces hansenii*)、金黄葡萄 球菌(*Staphylococcus aureus*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*;MRSA)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、单核细胞 增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*)。
- [0023] (7) 一种方案4所述的细菌素蛋白用于作为食品或化妆品中的天 然抗菌剂的使用。
- [0024] (8) 一种方案4所述的细菌素蛋白用于制造替代抗生素治疗具抗 药性病原菌的感染的蛋白药物的用途。
- [0025] (9) 一种水产养殖生物饲料,其特征不在于,其饲料配方含有上述 方案1所述的类芽孢杆菌菌株。
- [0026] (10) 如方案9所述的水产养殖生物饲料,其中,其用于增加水 产养殖生物感染亲水性产气单胞菌后的存活率。
- [0027] 发明效果
- [0028] 本发明的NPUST-1菌株,作为应用于水产养殖生物的益生菌是优 异的,可提升饲料转换率与饲料效益,并促进多种免疫相关基因、鱼 类免疫指标重要指标的表现,兼具促进成长及提升免疫反应的功 效,可有效提升水产养殖的渔获量。同时,该菌株对Ampicillin与磺胺剂 已产生抗性,生物防治上可共同使用。
- [0029] 该菌株所产细菌素Peocin,对包含养殖病原菌、食源性病原菌及 临床性病原菌的多种病菌具有抗菌活性,在水产养殖、食品、临床医 药、农业疾病防治多种领域具有广泛应用的潜力。此外,该细菌素 Peocin更具有耐高温、耐酸碱、耐蛋白酶作用、及在40℃高温下 长期 保存仍具有66%抗菌活性等特性。凭借此,该细菌素Peocin作为天然 抗菌添加物,不仅在需高温的饲料工序上,在需耐热性、pH耐受性的 产品开发上也具有优势。
- [0030] 附图简要说明
- [0031] 图1是表示NPUST-1的生长曲线、蛋白质浓度变化及抗菌活性变 化的图。
- [0032] 图2是表示NPUST-1所产抗菌蛋白Peocin经纯化后的抗菌活性 的图。
- [0033] 图3是抗菌蛋白Peocin的分子量与覆盖实验中抑菌带位置的 SDS-PAGE蛋白电泳 结果对照图。
- [0034] 图4是表示LC/MS分析鉴定中抗菌蛋白Peocin与饥饿/停滞期 DNA保护蛋白比对覆 盖率的图。

- [0035] 图5是抗菌蛋白Peocin分子量经LC/MS分析鉴定的图。
- [0036] 图6是以E.coliBL21 (DE3) /pET-28-peocin所表达的抗菌蛋白 Peocin的SDS-PAGE蛋白电泳图,以及含有pET-28空载体的破菌上清液与E.coliBL21 (DE3) /pET-28-peocin的破菌上清液的抗菌活性比较图。
- [0037] 图7是NPUST-1喂食斑马鱼的安全浓度测试结果图。
- [0038] 图8是表示不同温度下抗菌蛋白Peocin的抗菌活性的图。
- [0039] 图9是表示不同pH值下抗菌蛋白Peocin的抗菌活性的图。
- [0040] 图10是表示经蛋白酶Protease K与Trypsin处理后抗菌蛋白 Peocin的抗菌活性的图。
- [0041] 图11是表示在不同温度下存放70天后的抗菌蛋白Peocin的抗菌活性的图。
- [0042] 图12是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼的肠道的免疫基因表达量比较图。
- [0043] 图13是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼的肠道的免疫基因表达量比较图。
- [0044] 图14是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼的肠道的免疫基因表达量比较图。
- [0045] 图15是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼的全身的免疫基因表达量比较图。
- [0046] 图16是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼的全身的免疫基因表达量比较图。
- [0047] 图17是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼的全身的免疫基因表达量比较图。
- [0048] 图18是喂食含NPUST-1饲料的斑马鱼感染亲水性产气单胞菌后的存活率比较图。
- [0049] 图19是喂食含NPUST-1饲料的吴郭鱼的脾脏与头肾的免疫基因 TNF- α 及TGF- β 表达量比较图。
- [0050] 图20是喂食含NPUST-1饲料的吴郭鱼感染亲水性产气单胞菌后的存活率比较图。
- [0051] 图21是喂食含NPUST-1饲料的吴郭鱼的超氧化物歧化酶(SOD) 活性、呼吸爆发、吞噬细胞活性及血液中溶菌酶含量比较图。
- [0052] 实施方式
- [0053] 以下说明本发明实施方式,其并非限制本发明必须以下述方式实施,而是为了阐释本发明的详细内容与实施的效果。
- [0054] (菌种筛选鉴定)
- [0055] 从吴郭鱼养殖池中采取样本,将其序列稀释至100倍后,涂抹于含有指标菌株E.coli的TSB平板培养基上,在28℃培养4天,每天观察菌落的生长与抑菌圈的有无。将具有抑菌圈的菌落挑出,在TSB培养基筛选以四区划线法筛选为单一菌株。委托Bioresource Collection and Research Center (BCRC) 鉴定此菌株,根据其16s rDNA序列及生物化学特征,鉴定为爱媛类芽孢杆菌,并命名为Paenibacillus ehimensis NPUST-1(以下,简称为NPUST-1)。
- [0056] (菌株培养与保存)
- [0057] 将P.ehimensis NPUST1菌液接种于含有50ml TBS培养基的250 ml三角瓶中,并在恒温培养箱中以28℃、175rpm振荡培养24小时,此视为活化菌液。翌日取1ml活化菌液加入至含有100ml TBS培养基的500ml三角瓶中,并在恒温培养箱中以28℃、175rpm振荡培养24小时,取培养完成的菌液0.5ml分装至1.7ml微量离心管中,并加入50%甘油(glycerol)混和至最终甘油浓度为25%(v/v),此视为菌种保存液,随后将其放置于-80℃冰箱中保存。重新活化使用时,需先在28℃下,在TSB液态培养基培养24小时。

[0058] (菌株特性测定)

[0059] 将所述-80℃保存的NPUST-1加入至50ml的TSB液态培养基中培养,在28℃中培养24小时,使其活化。接着,取已活化的NPUST-1菌株的菌液1ml培养于100ml新鲜的TSB液态培养基中,定时取培养液测定吸光值OD₆₀₀绘制生长曲线,并抽取蛋白质浓度测定及抗菌活性检测所需的菌液样本。前48小时为每4小时测定及抽样1次,然后为每6小时测定及抽样1次。

[0060] 蛋白质浓度测定是使用蛋白质浓度测定试剂盒(Bio-Rad,USA)来检测。其经由蛋白质浓度检测试剂中的Coomassie brilliant blue G-250与蛋白质中的碱性和芳香族氨基酸残基结合而变色,根据吸光值OD₅₉₅测定蛋白质浓度。以牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA)作为实验的对照组(control),将其配置成浓度为0、20、40、60、80及100μg/ml,然后取50μl的各浓度BSA以及所述各时间点的NPUST-1菌液样本分别置入于96孔板中,随后再各别加入200μl经稀释的蛋白质浓度检测试剂,放置于抽屉中避光静置10分钟后,测定吸光值OD₅₉₅。将对照组数据做出标准曲线,再将样本数据经由标准曲线推算出蛋白质浓度。

[0061] 抗菌活性检测,使用刃天青(Resazurin)测定法评估。刃天青检测的原理是利用Resazurin经过粒线体中的NADH去氢酶作用后,会将原本呈现深蓝色的Resazurin还原成呈现粉红色的Resorufin,凭借此来检测细菌或是细胞的活性。将预先培养的指标菌株E.coli稀释为 1×10^7 CFU/ml,与配置浓度为0.25mg/ml刃天青染剂,以利于后续实验的进行。将96孔板分别以每3个孔作为1组样品的三重复,总共分成21组,而每个孔洞均加入601TSB培养基、10μl刃天青染剂、10μl指标菌株以及20μl样品,总量为100μl。所述20μl样品,为分别依序添加0、1、2、3...至20μl的培养液,并使用TSB培养基将所有样品补至总量为20μl。将完成的96孔板放置于37℃中培养12小时,并观察其结果变化。抗菌单位(Antibacterial unit)以AU表示,经由刃天青测定法,最小抑制颜色变化的培养液样品添加量定义为1AU,并将各时间点培养液中的抗菌活性以每毫升培养液含有多少AU表示。

[0062] 将生长曲线、蛋白质浓度变化及抗菌活性变化根据采样时间点绘制于图表上,进行比较。如图1所示,NPUST-1在培养36小时后开始进入平稳期,且在平稳期的后期,培养液中的蛋白质浓度以及抗菌物质的活性逐渐升高。此结果说明培养液中蛋白质的浓度与抗菌物质呈正相关,NPUST-1所生产的蛋白质具有抗菌能力。同时,抗菌物质是在平稳期后期才开始产生,在菌株进入死亡期时被大量表达。

[0063] (抗菌蛋白纯化)

[0064] 抗菌蛋白的纯化使用硫酸铵沉淀法,将抗菌蛋白盐析而沉淀。硫酸铵(Ammonium sulfate)是一种中性盐,对蛋白质具有良好的安定作用。该方法的原理是将离子容积较大的硫酸铵与水分子结合,使原本溶于水中的蛋白质暴露出蛋白质的非极性区域,蛋白质通过此非极性区域相互结合,使蛋白质形成大分子而沉淀。各种蛋白质会因其表面的非极性区域分布不同,分别在不同的硫酸铵饱和浓度之下沉淀。经由不同浓度的硫酸铵(10、20、30、40、50、60、70以及80%)测定,发现抗菌蛋白是在硫酸铵浓度为60%时被析出,因此使用60%硫酸铵进行下述抗菌蛋白的纯化。

[0065] 从-80℃保存的NPUST-1菌株取500μl菌液,加入至50ml TSB液态培养基中,培养在28℃中24小时,使其活化。接着,从其中取1ml菌液加入100ml TSB液态培养液中,再放置

于28℃培养4天。培养完成的菌液分装于50ml离心管中,以4000rpm离心20分钟后,将上清液取出并集中于烧杯中,然后将烧杯置于冰上并缓慢加入硫酸铵,使最终浓度为60%,待硫酸铵均匀溶解后,放置于4℃冰箱中16小时,使抗菌蛋白析出。沉淀完成的样品分装于50ml离心管中,以4000rpm 4℃离心(Eppendorf,5810R)30分钟,将其抗菌物质分离。沉淀的抗菌物质加入1ml PBS (pH 7.4)混和后,将混合液加入透析模中,放置于4℃冰箱中16小时,以1L PBS (pH 7.4)缓冲液(Buffer)进行透析。透析完成的样本,使用0.45μm微量过滤器去除杂质后,获得纯化的抗菌蛋白,保存于4℃冰箱中。

[0066] 将透析纯化后的抗菌蛋白样本进行抗菌活性测定,结果如图2所示,初步纯化的样本的抗菌活性明显高于未经过纯化的上清培养液。

[0067] (抗菌蛋白电泳分析)

[0068] 将所纯化抗菌蛋白,利用聚丙烯酰胺胶体电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/SDS-PAGE)配合抗菌测试,分析抗菌蛋白质分子量。其步骤如下:首先,将样本、标志物(marker)各别与样本缓冲液(Sample buffer)混合后,在100℃加热10分钟,随后置于冰上5分钟后,再将样品注入SDS-PAGE的凹槽中,以100伏特电压进行电泳120分钟后,将SDS-page胶片以Coomassie Brilliant Blue R-250染剂染色30分钟,再以Destain solution脱色至各条带清楚易辨为止。另一方面,将另一片以同样条件完成电泳步骤的SDS-page胶片,以ddH₂O重复冲洗2~3次,充分去除胶体上残留的运行缓冲液(Running buffer)后,将胶体缓慢覆盖于含有指标菌株E.coli的TSB培养基上,在28℃中隔夜培养,观察胶体所覆盖的区域中,培养基出现透明条带的位置。将透明条带位置与Coomassie Brilliant Blue R-250染剂染色的胶片比对。

[0069] 结果如图3,根据标志物(marker)对应箭头处所示抑菌带位置的分子量,经纯化抗菌蛋白的分子量大小约为10kDa。

[0070] (抗菌蛋白LC-MS鉴定)

[0071] 进一步地,利用液相层析仪和质谱仪鉴定(LC-MS鉴定)蛋白质身分与分子量大小。首先,根据下述步骤进行胶体内水解(gel digestion):将以Coomassie Brilliant Blue R-250染剂染色的SDS-PAGE胶片以手术刀切割,取出抗菌物质所在的蓝色条带,以ddH₂O冲洗后,以手术刀切割,取大小约1mm²的块状,以100μl ddH₂O或100μl 25mM碳酸氢铵(Ammonium bicarbonate/ABC)溶液清洗2次后,加入100μl含有50mM二硫苏糖醇(Dithiothreitol/DTT)的25mM ABC buffer(ABC缓冲液),于37℃中反应1小时,使蛋白复性。接着,以迷你微量离心机离心10秒后,以微量吸管去除上清液,再加入100μl含有100mM碘乙酸(Iodoacetic acid/IAM)的25mM ABC buffer,放置于室温下避光30分钟,使其烷基化。将反应完后的样本以迷你微量离心机离心10秒,使用微量吸管去除上清液,再加入100μl含有50%乙腈(Acetonitrile/ACN)的25mM ABC buffer,放置于超声波震荡机中脱色(退染)15分钟,震荡完后,以13000rpm离心1~2分钟,重复此震荡-离心步骤至少2次,直到胶体没有颜色。脱色完后的样本,以迷你微量离心机离心10秒后,使用微量吸管去除上清液,加入100μl 100%ACN反应5分钟,然后将液体吸出,以冷冻干燥机冻干5分钟。冻干后的胶体,加入100~150μl的25mM ABC buffer,以研磨杵压碎,大约左右各转半圈后,使用桌上型震荡器震荡稍微震荡,并以迷你微量离心机离心将碎片离下,接着,加入适量胰蛋白酶(Trypsin)放置于37℃中反应16小时。酶添加的比例为Enzyme:Protein=1:20(酶量

=蛋白的重量/回溶的体积(μl)/蛋白条带数量)。反应完成后,将样本的上清液取出收集,剩余的胶体碎片则加入100ml含有50%CAN以及5%三氟乙酸(Trifluoroacetic acid/TFA)的缓冲液(buffer),在超声波震荡机中震荡10秒后停止10秒,重复进行10次后以13000rpm离心2分钟后,将上清液收集(重复此震荡离心收集步骤3次)。

[0072] 收集的上清液以冷冻干燥机冻干,回溶后取适当体积进行LC-MS 鉴定。

[0073] 结果如图4、图5所示,该抗菌蛋白身分为饥饿/停滞期DNA保护蛋白,底线标示处为匹配的氨基酸,鉴定的覆盖率为36%,分子量大小为16.348kDa,将抗菌蛋白命名为peocin。

[0074] (以大肠杆菌载体表达抗菌蛋白peocin)

[0075] 将经由LC-MS所鉴定的此段功能性蛋白质基因构建(construct)于pET-28载体,并将载体转化(transformation)至大肠杆菌BL-21(DE3)中,称为E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin,使该大肠杆菌表达抗菌蛋白peocin。诱导表达步骤如下所述。

[0076] 将30 μl E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin菌液,以及3 μl Kanamycin(100mg/ml)加入至3ml LB液态培养基中活化24小时,活化后,将0.5ml培养液与50 μl Kanamycin(100mg/ml)加入至50ml LB液态培养基中,培养3个小时后,再加入50 μl 1M IPTG让转化蛋白大量表达,然后再培养9个小时,然后测定培养菌液的OD_{600nm}吸光值,然后将菌液浓缩成OD_{600nm}=60/ml,以1 \times PBS清洗1次,放置离心机中以1300rpm离心15分钟,将上清液去除后,再加入2ml 1 \times PBS放置于超声波细胞粉碎机下以启动5秒钟休息5秒钟的频率持续破菌5分钟,然后再放置于离心机中以4000rpm在4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下离心20分钟,将上清液吸出以0.45 μm 针筒过滤器过滤后,将样品保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中等待后续实验进行。将E.coliBL21(DE3)/pET-28以及E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin样品进行蛋白质电泳(SDS-PAGE),确认转化进去的载体有将抗菌蛋白大量表达出来,然后再将E.coliBL21(DE3)/pET-28以及E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin蛋白质样品以含有E.coli的TSB培养基进行抗菌活性测定及抑菌圈的测量,确认所表达蛋白质的抗菌能力。

[0077] 结果显示,在诱导E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin大量表达抗菌蛋白后,E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin大肠杆菌本身菌体的生长并未受影响,然而,若将E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin打破后离心之上清液进行抗菌活性分析,如图6所示,只含有pET-28空载体的破菌上清液(图6中样本1)并无菌活性,而E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin的破菌上清液则显示出明显的抗菌效果(图6中样本2)。此结果说明,所述饥饿/停滞期DNA保护蛋白(即peocin),表达于大肠杆菌胞内时并无抗菌活性,但当释放于胞外时则可展现抗菌效果,且该抗菌蛋白可通过E.coliBL21(DE3)/pET-28-peocin大量表达。

[0078] (NPUST-1投予鱼体安全剂量测试)

[0079] 以斑马鱼为实验动物模式,评估NPUST-1是否对鱼体具毒性,及其投予鱼体的安全剂量。测试的详细步骤如下:取出-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的NPUST-1甘油保存菌液,接种0.5ml保存菌液至50ml的TBS液态培养基中,并在28 $^{\circ}\text{C}$ 中培养24小时,翌日将培养后的菌液吸取1ml加入至100ml新鲜的TBS液态培养基中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 中培养24小时后以平板涂布法测定菌数,再将培养过后的P.ehimensisNPUST-1以12000 rpm离心10分钟去除上清培养液,随后再加入1倍的PBS缓冲溶液回溶,将菌液分别稀释成 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、及 1×10^{11} CFU/ml,将各浓度分别取10 μl 以30G注射针头注入至斑马鱼腹腔,各浓度分别注入10只斑马鱼,

注入过后将其分别饲养在独立缸中2个星期,期间观察鱼只健康状态以及死亡率。

[0080] 结果如图7所示,注射量为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 CFU/fish 时,斑马鱼的存活率仍为100%。由于注射高浓度NPUST-1 (1×10^8 CFU /fish) 并无死亡情形发生,由此得知,NPUST-1对鱼体应不具有毒性。同时,投予鱼体的安全剂量可为 1×10^6 或 1×10^7 CFU/fish。

[0081] (含NPUST-1菌株的饲料的配制)

[0082] 配置含NPUST-1菌株的饲料时,需预先培养NPUST-1,在饲料制造的当天将培养的NPUST-1与其他原料混合均匀。添加量只要在安全剂量内,并无特别限制。例如,可使用添加菌量为 1×10^6 CFU/g及 1×10^7 CFU/g的饲料作为斑马鱼及吴郭鱼的饲料,其配制步骤如下所述。

[0083] 饲料配方如表1、表2所示。将适量的NPUST-1菌液、鱼粉、大豆粕、麸质、玉米淀粉、羧甲基纤维素以及 α 淀粉等原料以粗秤称好后,放入搅拌器中搅拌。搅拌均匀后,缓慢加入含有维生素以及矿物质的菜籽油。均匀混合后,再缓慢并且间断地加入RO水,直至原料呈现面团状,再以手搓揉确认饲料团的水分,使饲料在后续塑型的步骤上不会过于湿润或者过于干燥,导致饲料难以塑型。确认湿度适中后,将饲料团取出,从饲料团中捏取一小团饲料塞入挤压器中,一边挤压,一边以美工刀将挤出的条状饲料切割适当的大小,将饲料均切割完后,将其均匀散布至盘子上后,放置于冷气风口下以冷风吹干,直到确认饲料干燥后,才可将其装袋,保存于4℃冰箱。进一步地,将饲料以研磨机磨碎,接着,分别以两种筛网过筛,一种为极细小的筛网,用以过滤过于细小的饲料,而另一种筛网为适中大小的筛网,用以筛出过于大颗的饲料。过筛的饲料需再各别加以研磨,进而制作出适合斑马鱼或吴郭鱼进食大小的饲料。

[0084] 表1

[0085]

原料成分	蛋白质(%)	脂质(%)
鱼粉	66.1	8.63
大豆粕	42	2
麸质	71.2	2
玉米淀粉	0.18	2.65

[0086] 表2

[0087]

原料成分	对照组	含 10^6 CFU/g组	含 10^6 CFU/g组
鱼粉	100	100	100
大豆粕	470	470	470
麸质	180	180	180
玉米淀粉	54	54	54
菜籽油	57	57	57
羧甲基纤维素	10	10	10
α 淀粉	100	100	100
维生素	10	10	10

矿物质	19	19	19
NPUST-1含量(CFU/kg)	0	1×10^9	1×10^{10}
总计(g)	1000	1000	1000

[0088] (NPUST-1作为益生菌授予方式)

[0089] 将所述含NPUST-1菌株的饲料,作为益生菌授予授予生物的方式,并无特别限制。例如,可如下述所列举的将NPUST-1作为益生菌 授予斑马鱼及吴郭鱼的方式。

[0090] 授予斑马鱼的方式:每天所喂食的饲料量为鱼体重的2%,并分两个时段喂食。

[0091] 授予吴郭鱼的方式:每天分为两个时段喂食,所喂食的饲料量为 鱼体重的5%,并于喂食开始后的每一周均重新测量体重,并调整相对 应的饲料量。

实施例

[0092] 以下揭示实施例而具体阐述本发明的目的与功效,但本发明内容 并非限定于这些实施例。

[0093] (抗菌蛋白Peocin对温度的耐受性评估)

[0094] 将本发明中经纯化的抗菌蛋白Peocin针对不同温度的耐受性进行 评估,测试步骤如下所述。

[0095] 取100 μ l Peocin分别放置于30、40、50、60、70、80、90、100 以及121 $^{\circ}$ C中反应1小时,30 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ C是使用恒温干浴槽(Major Science, MC-01N-110/220)设定条件温度,121 $^{\circ}$ C则是使用灭菌釜进行湿热灭菌。以放置于4 $^{\circ}$ C的Peocin为对照组(control)。1个小时后,以含有E.coli 的TSB培养基进行抗菌活性测定及抑菌圈的测量。

[0096] 结果如图8所示,纯化的Peocin在30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C与121 $^{\circ}$ C中处理1个小时后仍然能够保有 原来的抗菌活性,即使高温达121 $^{\circ}$ C处理1小时,抗菌活性仍然不会 受到破坏,此结果说明Peocin具有良好的温度耐受性。

[0097] (抗菌蛋白Peocin对pH的耐受性评估)

[0098] 将本发明中经纯化的抗菌蛋白Peocin针对不同pH的耐受性进行 评估。测试步骤如下所述,测试步骤如下所述。

[0099] 将纯化的抗菌物质在PBS buffer pH 7.4作为对照组,测试的pH 值为pH 2、3、4、5、6、7、8、9与10,pH测试Buffer分别为Glycine-HCl buffer (pH 2.0)、Citrate-phosphate Mcilvaine buffer (pH 3.0,4.0,5.0and 6.0)、Sodium-phosphate buffer (pH 7.0)、Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (pH 8.0 and 9.0)以及Glycine-NaOH buffer (pH 10.0)。首先,吸取500 μ l纯化的抗菌蛋白,分别分装于15ml离心管 中,然后再分别加入2ml不同pH值Buffer改变抗菌物质的pH值, 随后将其放置于28 $^{\circ}$ C中反应4小时。4个小时后,以含有E.coli的TSB 培养基进行抗菌活性测定及抑菌圈的测量。

[0100] 结果如图9所示,纯化的Peocin在3~10不同pH值的条件下处理4个小时后抗菌活性仍维持稳定,即使在pH 2的高酸性环境下,抗菌 活性仍维持87%。此结果说明Peocin具有良好的pH值耐受性。

[0101] (抗菌蛋白Peocin对蛋白酶的敏感性评估)

[0102] 将本发明中经纯化的抗菌蛋白Peocin针对蛋白酶的敏感性进行评 估,测试步骤如下所述。

[0103] 分别使用蛋白酶K (Proteinase K) 以及胰蛋白酶 (Trypsin) 两种蛋白酶进行测试。首先,取180 μ l的纯化抗菌蛋白peocin,加入1.7ml微量离心管中,然后分别加入20 μ l浓度为10mg/ml的蛋白酶K以及胰蛋白酶,使蛋白酶最终浓度为1mg/ml,将其置于37 $^{\circ}$ C中反应4小时。接着,以含有E.coli的TSB平板培养基进行抗菌活性测定以及抑菌圈的测量。Buffer为未添加抗菌蛋白的PBS缓冲溶液,对照组为不含蛋白酶的纯化抗菌蛋白peocin样品。结果如图10所示,纯化的Peocin经蛋白酶Protease K与Trypsin处理4小时后,仍表现出稳定的抗菌活性,由此得知,Peocin不会受到Protease K与Trypsin水解,蛋白酶敏感性低,有利于产业应用上保存。

[0104] (抗菌蛋白Peocin在不同温度下的稳定性评估)

[0105] 将本发明中经纯化的抗菌蛋白Peocin针对不同温度下的稳定性进行评估,测试步骤如下所述。

[0106] 将纯化后的抗菌蛋白Peocin样本分别放置于40 $^{\circ}$ C、室温、4 $^{\circ}$ C以及-20 $^{\circ}$ C中保存70天,在实验进行中,每个星期均抽取样品以含有E.coli的TSB培养基进行抗菌活性测定以及抑菌圈的测量。

[0107] 结果如图11所示,纯化的Peocin在-20 $^{\circ}$ C及4 $^{\circ}$ C的环境下保存70天仍还保有约90%的抗菌活性;在室温环境下保存70天仍保有约80%的抗菌活性;在40 $^{\circ}$ C的环境下保存70天约保存66%的抗菌活性。由此得知,即使将Peocin长时间保存在-20以及4 $^{\circ}$ C的环境下仍可保持活性稳定,有利于产业应用上保存。

[0108] (抗菌蛋白Peocin对各种病原菌的抗菌效果评估)

[0109] 将本发明中经纯化的抗菌蛋白Peocin对于其他各类水产养殖上的病原菌以及各类食源性病原菌等的抗菌效果进行评估,测试步骤如下所述。

[0110] 测试的菌种包含:水产养殖的病原菌的亲水性产气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)及酵母菌 (*Debaryomyces hansenii*);食品腐败与食品中毒菌的金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*;MRSA)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、及单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*);临床感染病原菌的绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*);植物叶斑性病原菌的伯克霍尔德菌 (*Burkholderia gladioli*)。将这些菌株各别培养后,制成含有菌株的固态培养基 (10⁶CFU/ml),待固态培养基凝固后,加入抗菌蛋白,进行抗菌活性测定以及抑菌圈的测量。

[0111] 结果如表3所示,Peocin对于上述不同来源的病源菌均具有抗菌效果。其中,抑制效果较佳的菌株为伯克霍尔德菌 (*B.gладиoli*)、无乳链球菌 (*S.agalactiae*)以及大肠杆菌 (*E.coli*)。由此可知,Peocin的抗菌功能具有广效性,且具有潜力应用于不同致病菌引起的疾病问题。

[0112] 表3

[0113]

病原菌	抑制圈直径大小 (cm)
-----	--------------

亲水性产气单胞菌	1.3±0.00
无乳链球菌	1.4±0.00
创伤弧菌	1.3±0.00
溶藻弧菌	1.1±0.03
副溶血弧菌	1.2±0.03
酵母菌	1.3±0.00
大肠杆菌	1.4±0.00
金黄葡萄球菌	1.1±0.05
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	1.1±0.05
肠道沙门氏菌	1.1±0.05
单核细胞增生性李斯特菌	1.0±0.05
绿脓杆菌	1.2±0.00
伯克霍尔德菌	1.5±0.05

[0114] (各种水产抗生素对于NPUST-1菌株的抑制效果评估)

[0115] 为了解NPUST-1菌株在作为益生菌使用的期间可与何种抗生素共同使用,测试各种水产养殖业上所使用的抗生素对NPUST-1菌株的抑制效果,测试步骤如下所述。

[0116] 测试的抗生素为安默西林(Amoxicillin)、(Ampicillin)、(Doxycycline)、(Erythromycin)、(Furazolidone)、(Flumequine)、(Ormetoprim)、(Oxytetracycline)、(Sulfadimethoxine)、(Chloramphenicol)、(Gentamycin)以及(Kanamycin)。测试的抗生素浓度为目前水产养殖产业上所限定的最高浓度(详如表4所示)。配置完所有的抗生素后,将这些抗生素用于含有P. ehimensis NPUST-1的TSB培养基,进行抗菌活性测定以及测量抑菌圈的大小。

[0117] 结果如表4所示,除了抗生素Ampicillin与磺胺剂 Sulfadimethoxine对P. ehimensis NPUST-1无抑制效果外,其他测试药物对P. ehimensis-NPUST-1有抑制作用,在培养基上分别呈现直径大小不等明显的抑菌环。由此得知,NPUST-1虽对大部分抗生素仍无抗药性,但对抗生素Ampicillin与磺胺剂Sulfadimethoxine已产生抗性,用于水产养殖产业上作为生物防治时,可共同使用而不会使NPUST-1丧失其功效。

[0118] 表4

[0119]

抗生素	限定的最高浓度	最终浓度	抑制圈大小
安默西林	40μg/g	40μg	2.30±0.10
安比西林	20μg/g	20μg	-
脱氧羟四环霉素	50μg/g	50μg	3.30±0.00
红霉素	50μg/g	50μg	1.73±0.06
富来顿	2μg/g	2μg	1.00±0.00
氟灭菌	20μg/g	20μg	5.67±0.06
欧美德普	50μg/g	50μg	4.60±0.00
羟四环霉素	50μg/g	50μg	2.13±0.06
磺胺剂	100μg/g	100μg	-

氯霉素	80ppm	80ppm	2.67±0.06
庆大霉素	4ppm	4ppm	2.03±2.03
康霉素	100ppm	100ppm	1.13±0.03

[0120] (NPUST-1提升斑马鱼免疫基因表达的效果)

[0121] 以斑马鱼为试验对象,评估NPUST-1作为益生菌提升免疫基因表达的效果。其详细步骤如下所述。

[0122] 使用中央研究院斑马鱼中心的斑马鱼AB strain为受试对象。将每缸15只斑马鱼饲养于20L独立缸中,平均体重为 $0.61 \pm 0.04g$ 。喂食实验分成3缸对照组、3缸喂食含有 1×10^6 CFU/g以及3缸喂食含有 1×10^7 CFU/g,每天所喂食的饲料量为鱼体重的2%,并分两个时段喂食。环境的部分每天以吸虹管清洁鱼缸、定期更换白棉以及控管光照时间(14小时光照/10小时黑暗)。喂食1个月后,进行后续的免疫基因表达量分析。

[0123] 分析的组织为斑马鱼的肠道以及全身,将鱼只的肠道取出浸泡于含有1ml TriPure的2ml微量离心管中,而剩余的全身以解剖剪刀剪碎后,放入含有4ml TriPure的15ml离心管中,萃取组织RNA。将组织放置于TriPure中,使用均质机加以均质,然后加入200 μ l Chloroform,上下轻微摇晃30秒,随后放置于冰上5分钟。等待组织碎块沉淀后在4℃的环境下以12000rpm离心15分钟让样品分层,离心完后将透明的上清液取出,放置于新的1.7ml微量离心管中,并加入500 μ l的异丙醇(Isopropanol)混合,然后在室温下静置10分钟等待RNA沉淀下来,10分钟后在4℃的环境下以12000rpm离心10分钟,将RNA离心至微量离心管底部,然后将上清液去除掉以75%酒精清洗,再以12000rpm离心10分钟去除大部分酒精后,放置于桌上静置,等待酒精完全蒸发,然后再加入20 μ l 0.1%DEPC水回溶RNA,随后以超微量分光光度计检测RNA浓度,检测完后,使用Bio-Rad IscriptTM cDNA Synthesis kit将RNA转为cDNA放置于-20℃中保存,然后以表5所列各基因的引物,进行实时聚合酶链锁反应(Real-time PCR)检测免疫基因的表达量。

[0124] 表5

[0125]

免疫基因	引物序列 (5' → 3')	参考序列
Interleukin-1 β (IL-1 β)	TGGACTTCGCAGCACAAAATG	AY340959
	CACTTCACGCTCTTGGATGA	
Interleukin-6 (IL-6)	TCAACTTCTCCAGCGTGATG	JN698962
	TCTTCCCTCTTTTCCTCCTG	
Interleukin-10 (IL-10)	TCACGTCATGAACGAGATCC	BC163031
	CCTCTTGCATTTACCATATCC	
Interleukin-15 (IL-15)	ATGTCATTGGAACCTCAGAGGTTTG	BC162843
	CTGTTCTGGATGTCCTGCTTGA	
Interleukin-21 (IL-21)	AATCATTTCATCGTGGACAGTGTGT	NM_001128574
	AACGTTCCGGCTGTTGACCAT	
Tumor necrosis factor- α (TNF- α)	AAGGAGAGTTGCCTTTACCG	BC165066
	ATTGCCCTGGGTCTTATGG	
Interferon-gamma (IFN- γ)	GAGAGGCTGGCACATGTTCA	AB126869
	CCCATAGCGTTTCTGCATACG	
Nuclear factor-kB (NF-kB)	AAGAGGACCAAATAAGCACAG	AY163838
	AAG TCCAAGGTACATCGCCATGA	
Cyclooxygenase-2 α (COX-2 α)	GATCTCCCAAATGCCAAGCA	NM_153657
	GGGCGAAGAAAGCAAACATG	
Cyclooxygenase-2 β (COX-2 β)	GAGCTGCCAGACGTGAAGATG	NM_001025504
	GGGCGAAGAAAGCGAACATA	
Complement component c3b	CGTCTCCGTACACCATCCATT	NM_131243
	GGCGTCTCATCAGGATTTGTTAC	
Lysozyme	CGTGGATGTCCTCGTGTGAA G	NM_139180
	CCAATGGAGAATCCCTCAA	
Toll-like receptor-1 (TLR-1)	CAGAGCGAATGGTGCCACTAT	AY389444
	GTGGCAGAGGCTCCAGAAGA	
Toll-like receptor-3 (TLR-3)	TGGAGCATCACAGGGATAAAGA	AY616582
	TGATGCCCATGCCTGTAAGA	
Toll-like receptor-4 α (TLR-4 α)	TGCCTGGTGTGCTTTGA	EU551724
	CCTCTCCGCAACATCTTCCA	
Toll-like receptor-9 (TLR-9)	CGGACACCCAGTATGATGCA	NM_001130594
	CCCCGGTTCTCCAATCTCA	
MX	GAGTTTCGACCTTGGCACAGAGA	AF533769
	CTGGTCAGCTAGACGCTTGCT	
Elongation factor 1 α (EF-1 α)	AACAGCTGATCGTTGGAGTCAA	AY422992
	TTGATGTATGCGCTGACTTCCT	

[0126] 分析结果如图12、图13、图14、图15、图16、图17及表5所示,斑马鱼肠道组织中 Interleukin (IL) -1 β 、IL-6、IL-10、Cyclooxygenase (COX) -2b、Toll-like receptor

(TLR)-9、补体C3b与溶菌酶表达量显著提高,且斑马鱼全身的IL-6、Tumor necrosis factor (TNF)- α 、COX-2b、TLR-4、TLR-9、补体C3b与溶菌酶的表达量也显著提升,由此得知,将NPUST-1作为益生菌喂食斑马鱼后,具有提升免疫基因表达的效果。

[0127] (NPUST-1提升斑马鱼感染病菌后的存活率的效果)

[0128] 通过斑马鱼感染亲水性产气单胞菌实验,评估将NPUST-1作为益生菌喂食斑马鱼后,是否可以提高感染后鱼体的存活率。其详细步骤如下所述。

[0129] 此实验将斑马鱼分为空白组、对照组、实验组1以及实验组2,共4个组别,其中,实验组1喂食 1×10^6 CFU/g的含NPUST-1饲料,实验组2喂食 1×10^7 CFU/g的含NPUST-1饲料。每个组别分别设置3缸,而每一缸以独立外挂式过滤器饲养15只斑马鱼,将斑马鱼喂食1个月之后,进行感染实验。将斑马鱼喂食一个月后,以30G注射针头注入10 μ l样品至斑马鱼的腹腔,其中,空白组注入样品为PBS,对照组以及实验组为 1×10^6 CFU/ml的病原菌亲水性产气单胞菌。接着,饲养与观察鱼只状况1个星期,并记录鱼只死亡率。

[0130] 结果如图18所示,PBS对照组存活率为100%,对照组存活率为22.2%, 10^6 CFU/g实验组存活率为30.5%,而 10^7 CFU/g实验组存活率为44.4%,喂食含有 10^7 CFU/g的NPUST-1饲料提升了20%的存活率。由此得知,将NPUST-1作为益生菌喂食斑马鱼,能够有效提高感染后鱼体的存活率。

[0131] (NPUST-1提升吴郭鱼免疫基因表达的效果)

[0132] 以吴郭鱼为试验对象,评估NPUST-1作为益生菌提升免疫基因表达的效果。其详细步骤如下所述。

[0133] 以台湾海洋大学水产养殖学系龚纮毅老师实验室所繁殖的吴郭鱼为受试对象。将吴郭鱼饲养于10L鱼缸中,每缸饲养20只鱼,平均体重为 0.27 ± 0.02 g,喂食实验分成3缸对照组、3缸喂食 1×10^6 CFU/g NPUST-1饲料组以及3缸喂食 1×10^7 CFU/g NPUST-1饲料组,每天分为两个时段喂食,所喂食的饲料量为鱼体重的5%,并于喂食实验开始后的每一周均重新测量体重,并调整相对应的饲料量。待喂食2个月后,进行后续的免疫基因表达量分析。

[0134] 此步骤将分析的部位为吴郭鱼的头肾以及肠道。将吴郭鱼饲养2个月后,将鱼只的头肾以及肠道取出,并分别浸泡于含有1ml TriPure 的2ml微量离心管中,萃取组织RNA。将取出的组织放置于TriPure 中,使用均质机加以均质,然后加入200 μ l氯仿(Chlorofbrm),上下轻微摇晃30秒,随后放置于冰上5分钟。等待组织碎块沉淀后在4 $^{\circ}$ C的环境下以12000rpm离心15分钟让样品分层,离心完后将透明的上清液取出,放置于新的1.7ml微量离心管中,并加入500 μ l的异丙醇(Isopropanol)混合,然后在室温下静置10分钟等待RNA沉淀下来,10分钟后在4 $^{\circ}$ C的环境下以12000rpm离心10分钟,将RNA离心至微量离心管底部,然后将上清液去除掉以75%酒精清洗,再以12000rpm离心10分钟去除大部分酒精后,放置于桌上静置,等待酒精完全蒸发,然后再加入20 μ l 0.1%DEPC水回溶RNA,随后以超微量分光光度计检测RNA浓度,检测完后使用Bio-Rad IscriptTM cDNA Synthesis kit将RNA转为cDNA放置于-20 $^{\circ}$ C中保存,然后以表6所列各基因的引物进行实时聚合酶链锁反应检测免疫基因TNF- α 及TGF- β (Transforming growth factor beta)的表达量。

[0135] 表6

[0136]

免疫基因	引物序列 (5' → 3')	参考序列
Tumor necrosis factor- α (TNF- α)	CCAGAAGCACTAAAGGCGAAGA	AY428948.1
	CCTTGGCTTTGCTGCTGATC	
Transforming growth factor- β (TGF- β)	GTTTGAACCTCGGCGGTACTG	XM_003459454.2
	TCCTGCTCATAGTCCCAGAGA	

[0137] 分析结果如图19及表6所示,吴郭鱼脾脏与头肾中TNF- α 以及 TGF- β 表达量显著提高,由此得知,将NPUST-1作为益生菌喂食吴郭鱼后,具有提升免疫基因表达的效果。

[0138] (NPUST-1提升吴郭鱼感染病菌后的存活率的效果)

[0139] 通过吴郭鱼感染亲水性产气单胞菌实验,评估将NPUST-1作为益生菌喂食吴郭鱼后,是否可以提高感染后鱼体的存活率。其详细步骤如下所述。

[0140] 将吴郭鱼分为空白组、对照组、实验组1以及实验组2,共4个组别,其中,实验组1喂食 1×10^6 CFU/g的含NPUST-1饲料;实验组2喂食 1×10^7 CFU/g的含NPUST-1饲料,对照组喂食不含NPUST-1的饲料。每个组别分别设置3缸,并以循环养殖设备分别饲养15只吴郭鱼。将吴郭鱼喂食一个月后,以30G注射针头注入 $20 \mu\text{l}$ 样品至吴郭鱼的泄殖腔,其中,空白组注入样品为PBS,对照组以及实验组为 4×10^7 CFU/ml的病原菌亲水性产气单胞菌。接着,饲养与观察鱼只状况1个星期,并记录鱼只死亡率。

[0141] 结果如图20所示,结果显示PBS对照组存活率为100%,对照组为16.1%, 1×10^6 CFU/g实验组为50.5%, 1×10^7 CFU/g实验组为38.5%。由此得知,将NPUST-1作为益生菌喂食吴郭鱼,能够有效提高感染后鱼体的存活率。

[0142] (NPUST-1提升吴郭鱼巨噬细胞免疫反应的效果)

[0143] 巨噬细胞在鱼类的免疫系统中扮演重要功能,因此进一步抽取所述“NPUST-1提升吴郭鱼免疫基因表达的效果”评估试验中受试吴郭鱼的巨噬细胞,检测喂食含NPUST-1饲料的吴郭鱼在下述鱼类免疫调节的主要指标的表现:超氧化物歧化酶(SOD)的产生、吞噬细胞活性、呼吸爆发与血液中溶菌酶的含量。巨噬细胞的分离步骤,以及各指标的检测步骤如下所述。

[0144] 巨噬细胞分离:以不同浓度的Percoll通过离心将巨噬细胞分离。首先,将饲养后吴郭鱼的头肾取出,以1倍PBS pH(7.6)冲洗后,置于2ml微量离心管中,再加入1ml1倍PBS pH(7.6),以均质机均质后置于冰上。Percoll使用的浓度为28/51% (V/V),先将28%以及51%的Percoll分别配置好,然后先加入2ml 28%的Percoll至15ml离心管中,接着,再使用注射针头将51%的Percoll从15ml离心管的底部缓慢注入,让28%的Percoll完整覆于51%的Percoll的上方,形成层次。其后,从上方缓慢加入 $200 \sim 500 \mu\text{l}$ 的头肾样品,最后再以1ml微量吸管吸取1ml 1倍PBS pH(7.6)缓慢加入压于样品的上方,保持51%Percoll-28%Percoll-1-头肾样品-PBS的分明层次。接着,将离心管放置于离心机中,以 $400 \times g$ 在 4°C 下离心30分钟,离心结束后,巨噬细胞会夹在两种浓度的Percoll中间。将中间雾油层的巨噬细胞以微量吸管取出放置于1.7ml微量离心管中,置于冰上保持低温的状态,并以血球计数板计数,将巨噬细胞稀释成 1×10^6 cell/ml,以利于后续实验的进行。

[0145] 超氧化物歧化酶(SOD)分析:首先吸取 $200 \mu\text{l}$ 浓度为 1×10^6 cell/ml的巨噬细胞悬浮液放置于1.7ml微量离心管中。将 $200 \mu\text{l}$ 巨噬细胞悬浮液加入 $500 \mu\text{l}$ 的HBSS混合均匀,放

置于离心机中以 $400 \times g$ 在 4°C 的环境下离心20分钟,然后去除上清液并重复加入 $500\mu\text{l}$ 的HBSS以及离心,此步骤需重复进行三次,用以清洗巨噬细胞。将清洗完的巨噬细胞加入 $150\mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}$ pH 7.8悬浮,以超声波细胞粉碎机将细胞打破,放置于离心机中以 $1500 \times g$ 在 4°C 的环境下离心10分钟,将上清液取出后以Bio rad蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度,吸取 $100\mu\text{l}$ 上清液至 1.7ml 微量离心管中再依序加入 $250\mu\text{l}$ 0.15M Phosphatebuffer、 $75\mu\text{l}$ 0.13M Methionine、 $75\mu\text{l}$ 1mM Na_2EDTA 、 $75\mu\text{l}$ 0.63mM NBT以及 $150\mu\text{l}$ $7.5\mu\text{M}$ 核黄素(Riboflavin),然后放置于 25°C 培养箱中光照反应10分钟,反应结束后吸取 $200\mu\text{l}$ 至96孔板中以分光光度计测定吸光值 $\text{OD}_{560\text{nm}}$ 以及测定样品吸光值。

[0146] 超氧化物歧化酶(SOD)

[0147] 公式: $(\text{Blank}-\text{Sample}) / (\text{Blank}/2) \times 6 / \text{Protein}(\text{mg})$

[0148] SOD活性单位(U):单位时间抑制50%硝基四氮唑蓝(Nitroblue tetrazolium/NBT)还原的酶量

[0149] 吞噬细胞活性(PA)分析:此实验需要在无菌操作台内进行,在操作荧光乳珠的时候需要全程避光。在实验开始前需要先配置荧光乳珠以及碘化物(PI)。配置荧光乳珠是先取 15ml L-15培养液于 15ml 离心管中之后加入 $0.4\mu\text{l}$ 荧光乳珠,而碘化物以灭菌过的无菌水配置,其浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$ 。首先先取 $300\mu\text{l}$ 巨噬细胞样品加入至12孔细胞培养板中,静置1个小时让巨噬细胞吸附在孔洞中,然后将上清液倒除再加入 $300\mu\text{l}$ L-15培养液重复清洗3次,清洗完后加入 $300\mu\text{l}$ 配置好的荧光乳珠,随后以铝箔纸将12孔细胞培养板包起来静置2个小时,等待反应结束后,加入 $300\mu\text{l}$ PBS清洗一次将多数未摄取的荧光乳珠清除,再加入 $300\mu\text{l}$ 1%甲醛固定30分钟,反应过后以 $300\mu\text{l}$ PBS清洗2至3次将残留甲醛清洗掉,再加入 $300\mu\text{l}$ 碘化物染色10分钟,染色过后以 $300\mu\text{l}$ PBS冲洗两次,清洗完后放置于Olympus IX 50荧光显微镜下观察巨噬细胞吞噬情形。

[0150] 免疫分析的呼吸爆发(O_2^-)分析:此实验分别对对照组以及实验组,先将吸取 $100\mu\text{l}$ 0.2% Poly-L-Lysine于96孔板中放置30分钟,然后再加入 $100\mu\text{l}$ 巨噬细胞样品,放置于离心机中以 $300 \times g$ 离心20分钟,去除上清液后对照组加入 $100\mu\text{l}$ MCBSS;实验组加入 $100\mu\text{l}$ Zymosan后静置30分钟,反应结束后将上清液去除,以 $100\mu\text{l}$ MCHBSS重复清洗3次,然后加入 $100\mu\text{l}$ 0.3% NTB染色30分钟,30分钟后加入 $100\mu\text{l}$ 100%甲醇终止反应,轻微摇晃后将上清液去除,再以 $100\mu\text{l}$ 70%甲醇重复清洗3次,清洗过后将上清液去除,放置于桌面风干约20至30分钟,等待风干后再加入 $120\mu\text{l}$ 2M KOH以及 $140\mu\text{l}$ DMSO,静置2分钟后以分光光度计测定吸光值 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 。

[0151] 溶菌酶活性分析:此步骤中以25G注射针头自吴郭鱼的尾柄采取血液样品,将抽取出来的血液放置 1.7ml 微量离心管中,将离心管斜躺放置于 4°C 冰箱中24小时,等待血浆与血球分离。在实验开始前需先行配置 0.05M Sodiumphosphate buffer(磷酸三钠缓冲液),然后以 0.05M Sodiumphosphate buffer配置 $1.6\text{mg}/\text{ml}$ 溶菌酶以及 $0.2\text{mg}/\text{ml}$ *Micrococcus luteus*菌液,先将溶菌酶作为标准品进行实验测试,将溶菌酶稀释成 0 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 以及 $1.6\text{mg}/\text{ml}$,各吸取 $10\mu\text{l}$ 放置于96孔板中,再加入 $200\mu\text{l}$ *M. luteus*菌液混合,放置于分光光度计下以 $\text{OD}_{530\text{nm}}$ 测定反应1分钟以及反应6分钟的数值,通过OD值的变化来判断溶菌酶的活性,将测出来的数值做出标准曲线,用以推断后续实验样品中溶菌酶的量。标准曲线做完后再开始测定血液样品,将放置于 4°C 冰箱中24小时的血液样

品取出,放置于离心机中以 $3000 \times g$ 在 4°C 的环境下离心5分钟,然后将上层的血浆吸出放置于新的1.7ml微量离心管中,放置于冰上接着进行溶菌酶分析的实验,或者保存于 -80°C 冰箱中。将血浆取出后重复进行上述的步骤,将血浆样品吸取 $10\mu\text{l}$ 放置于96孔板中,再加入 $200\mu\text{l}$ *M. luteus* 菌液混合,放置于分光光度计下以 $OD_{530\text{nm}}$ 测定反应1分钟以及反应6分钟的数值,通过OD值的变化来判断血浆中溶菌酶的活性,以及利用标准曲线推算血浆中溶菌酶的含量。

[0152] 结果如图21所示,NPUST1 10^6CFU/g 与NPUST1 10^7CFU/g 吞噬细胞活性、呼吸爆发以及溶菌酶活性均有提高的现象,在SOD的部分只有喂食*P. ehimensis* NPUST1 10^7CFU/g 有提升的现象。由此得知,将NPUST-1作为益生菌喂食吴郭鱼,具有提升巨噬细胞免疫反应的效果。

[0153] (NPUST-1促进吴郭鱼成长的效果)

[0154] 对“NPUST-1提升吴郭鱼免疫基因表达的效果”中的各组别吴郭鱼,测定体成长、饲料转换率及饲料效益,评估NPUST-1促进吴郭鱼成长的效果。其详细步骤如下所述。

[0155] 开始喂食吴郭鱼前,先将鱼的体重纪录起来作为初始体重(WI),然后每星期重新测量一次体重并依照体重调整饲料量,此实验持续2个月后再记录最后一次鱼的体重作为最终体重(WF),然后将所有喂食的饲料量加总起来作为总进食量(F),代入下述公式计算出体重增长(WG)、饲料转换率(Feed conversion ratio/FCR)、饲料效益(Feed efficiency ratio/FER)以及特殊成长率(SGR)等。

[0156] 公式:

$$[0157] \quad \text{WG} = \text{WF} - \text{WI}$$

$$[0158] \quad \text{FCR} = \text{F} / \text{WF} - \text{WI}$$

$$[0159] \quad \text{FER} = \text{WF} - \text{WI} / \text{F}$$

$$[0160] \quad \text{SGR} = (\text{WF} - \text{WI}) / \text{喂养时间} \times 100$$

[0161] 结果如表7所示,喂食含有 10^6CFU/g 与 10^7CFU/g NPUST-1的饲料,吴郭鱼的体重增长(WG)分别为 $47.46 \pm 1.85\text{g}$ 与 $50.01 \pm 0.48\text{g}$,显著高于未喂食对照组的 $29.63 \pm 0.46\text{g}$;饲料转换率(FCR)分别为1.1与1.08,相较于未喂食*P. ehimensis* NPUST-1的对照组的1.38显著良好;饲料效益(Fernandes CF)分别为0.91与0.92,相较于未喂食*P. ehimensis* NPUST-1的对照组的0.73显著较高。由此得知,将NPUST-1作为益生菌喂食吴郭鱼后,可促进鱼体成长并提升饲料效率。

[0162] 表7

[0163]

成长数值	处理条件(饲料是否含 NPUST-1)		
	对照组	含 10^6 CFU/g 组	含 10^7 CFU/g 组
初始体重 (WI)	5.53 ± 0.455	5.40 ± 0.475	5.57 ± 0.69
最终体重 (WF)	37.25 ± 3.59	52.86 ± 2.32	55.58 ± 0.22
体重增长 (WG)	31.93 ± 3.53	47.46 ± 1.85	50.01 ± 0.48
存活率 (%)	88.8 ± 3.85	95.56 ± 3.85	97.78 ± 3.85
饲料转换率(FCR)	1.38 ± 0.09	1.10 ± 0.04	1.08 ± 0.01
饲料效益	0.73 ± 0.05	0.91 ± 0.04	0.92 ± 0.01
特殊成长率(%)	57.02 ± 6.32	84.75 ± 3.31	89.30 ± 0.87

[0164] 工业实用性

[0165] 本发明的NPUST-1菌株,作为益生菌喂食水产养殖生物,可提高免疫调节与抵抗疾病感染,降低养殖生物死亡率。

[0166] 另一方面,由于本发明的NPUST-1菌株所产的细菌素Peocin,对于多种养殖病原菌、食源性与临床性抗药性病源菌具有抗菌效果,可将该细菌素添加于水产饲料中,抵抗疾病感染并降低养殖生物死亡率。同时,该细菌素纯化为抗菌蛋白后,在各种环境下都具有良好的保存性,可作为天然抗菌剂添加于食品或化妆品中,提升产品的保存时间。此外,由于该经纯化的抗菌蛋白对于已含有抗药性的MRSA致病菌株具有抗菌功能,在医药产业上可以进一步开发,作为蛋白药物,替代抗生素治疗抗药性致病菌感染。上述这些技术手段,未曾见诸于本技术领域的发明中,实属创新的发明。

[0167] 上述所使用的用语及说明,是用以说明本发明的实施方式,但本发明并非限定于此。只要是不脱离本发明申请专利范围、具备本发明的技术特征而有修饰变化者,也包含在本专利所保护范围内。

序列表

<110> 屏東科技大学 (National Pingtung University of Science and Technology)

<120> 一种产细菌素的类芽孢杆菌及其应用

<130> 18C10526CN

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 146

<212> PRT

<213> 类芽孢杆菌 (*Paenibacillus ehimensis*)

<220>

<221>

<223> 类芽孢杆菌菌株所生产的饥饿/停滞期DNA保护蛋白

<400> 1

```

Met Asn Glu Gln Leu Thr Val Leu Leu Asn Asn Gln Ile Ala Asn Trp
           5                10                15
Ser Val Leu Tyr Val Lys Leu His Asn Tyr His Trp Tyr Val Lys Gly
           20                25                30
Pro Gln Phe Phe Thr Leu His Thr Lys Phe Glu Glu Leu Tyr Thr Glu
           35                40                45
Ala Ala Leu His Val Asp Ala Leu Ala Glu Arg Leu Leu Ala Leu Gly
           50                55                60
Gly Lys Pro Val Ala Thr Met Ser Gly Ser Leu Arg Leu Ala Ser Val
65                70                75                80
Arg Glu Ala Glu Gly Glu Glu Ser Ala Glu Arg Met Val Ala Ala Leu
           85                90                95
Val Asn Asp Phe Thr Leu Ile Ile Gly Glu Leu Lys Ser Gly Met Lys
           100               105               110
Tyr Ala Glu Ser Val Gln Asp Glu Thr Thr Gly Asp Leu Leu Leu Ala
           115               120               125
Ile His Ser Ser Leu Glu Lys His Val Trp Met Leu Asn Ala Phe Leu
           130               135               140
Gly Asn
145

```

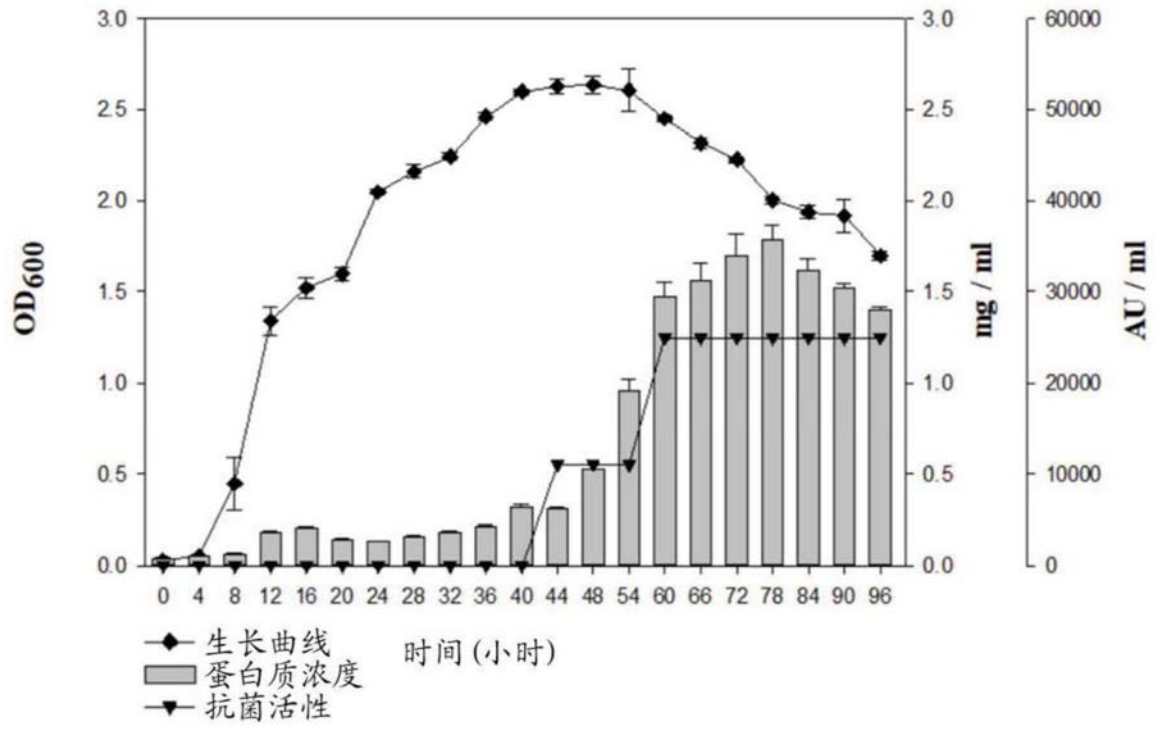


图1

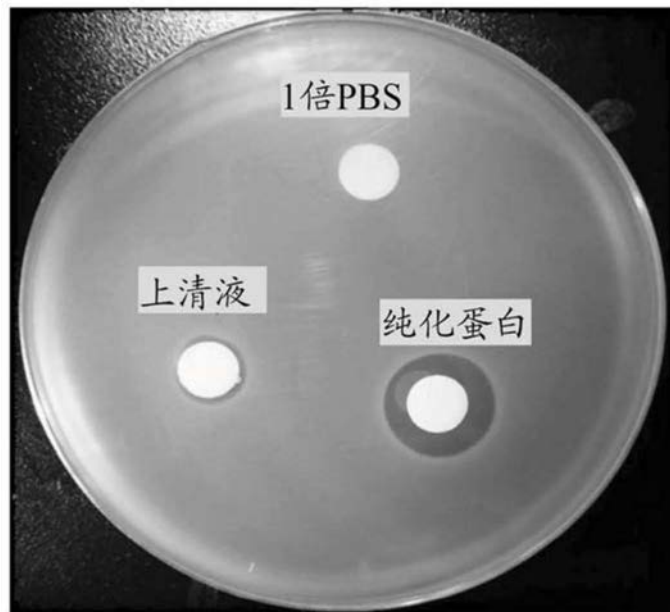


图2

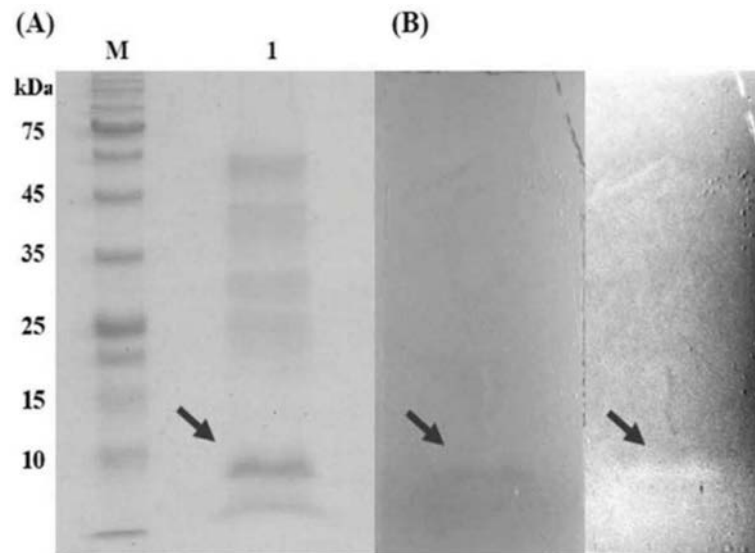


图3

定义：饥饿/停滞期DNA保护蛋白 [*Paenibacillus ehimensis*]

ACCESSION WP_025850494

MNEQLTVLLNNQIANWSVLYVKLHNYHWYVKGPF^TLHTKF
 EELYTEAALHVDALAE^RLLALGGKPVATMSGSLRLASVREAEG
 EESAERMVAALVNDFTLIIGELKSGMKYAESVQDETTGDLLLAI
 HSSLEKHVWMLNAFLGN

图4

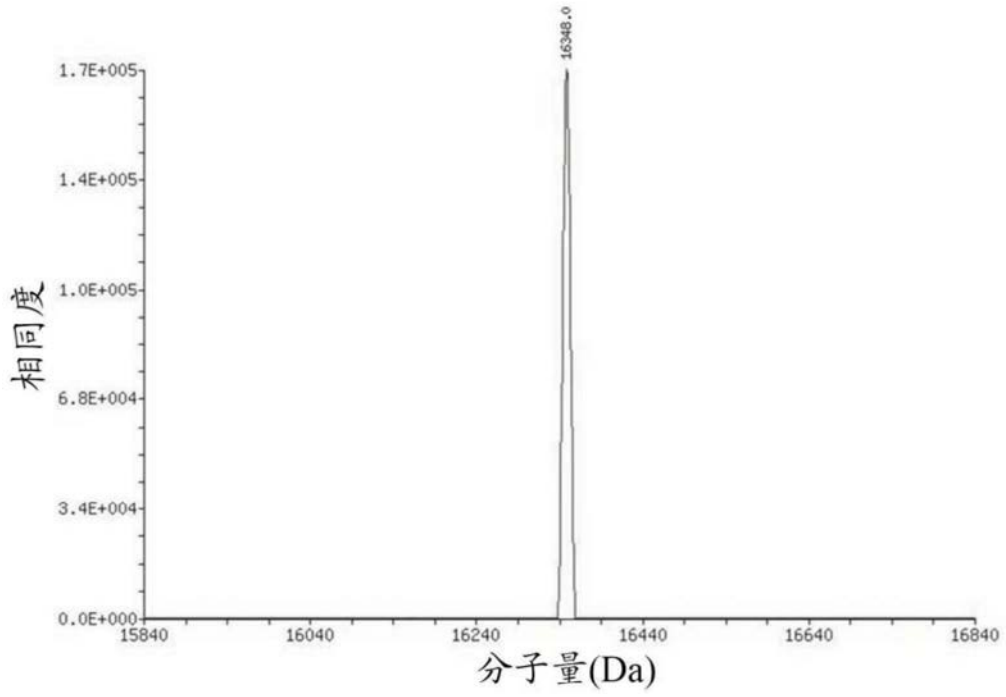


图5

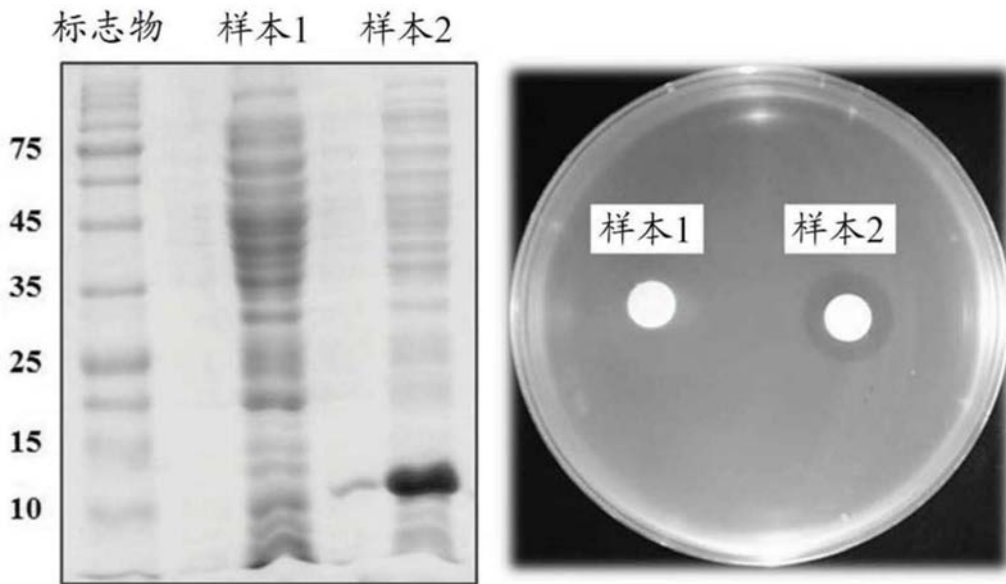


图6

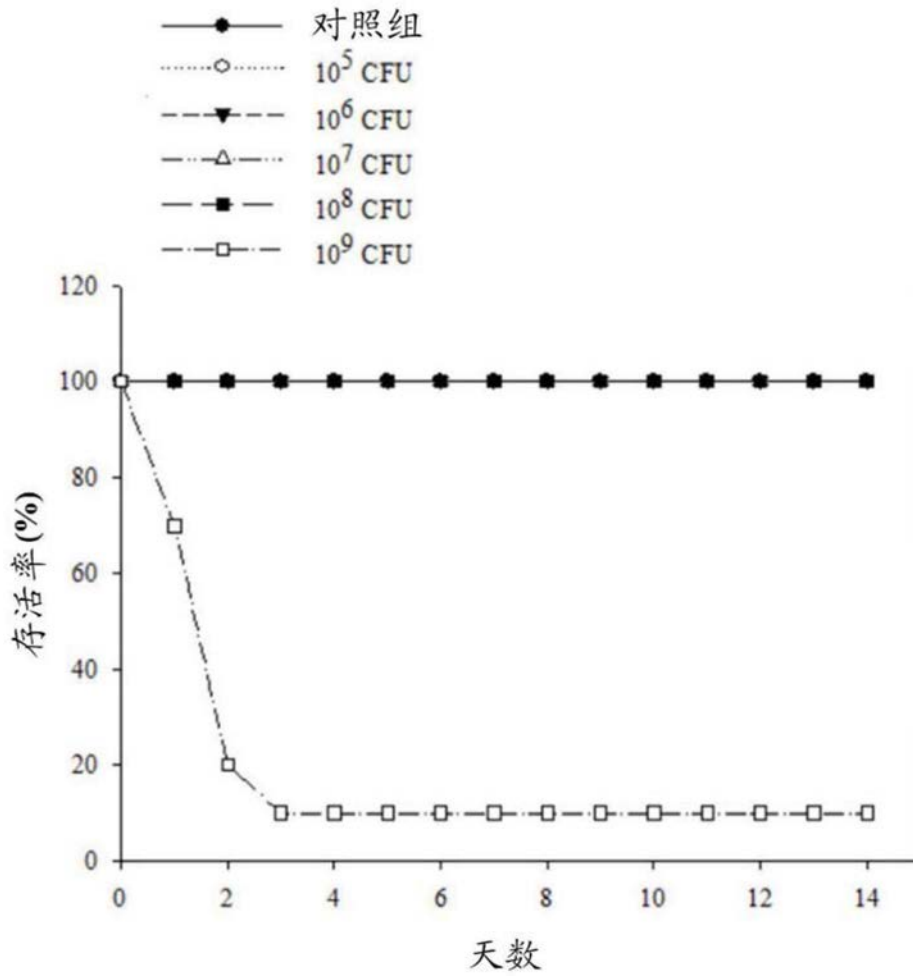


图7

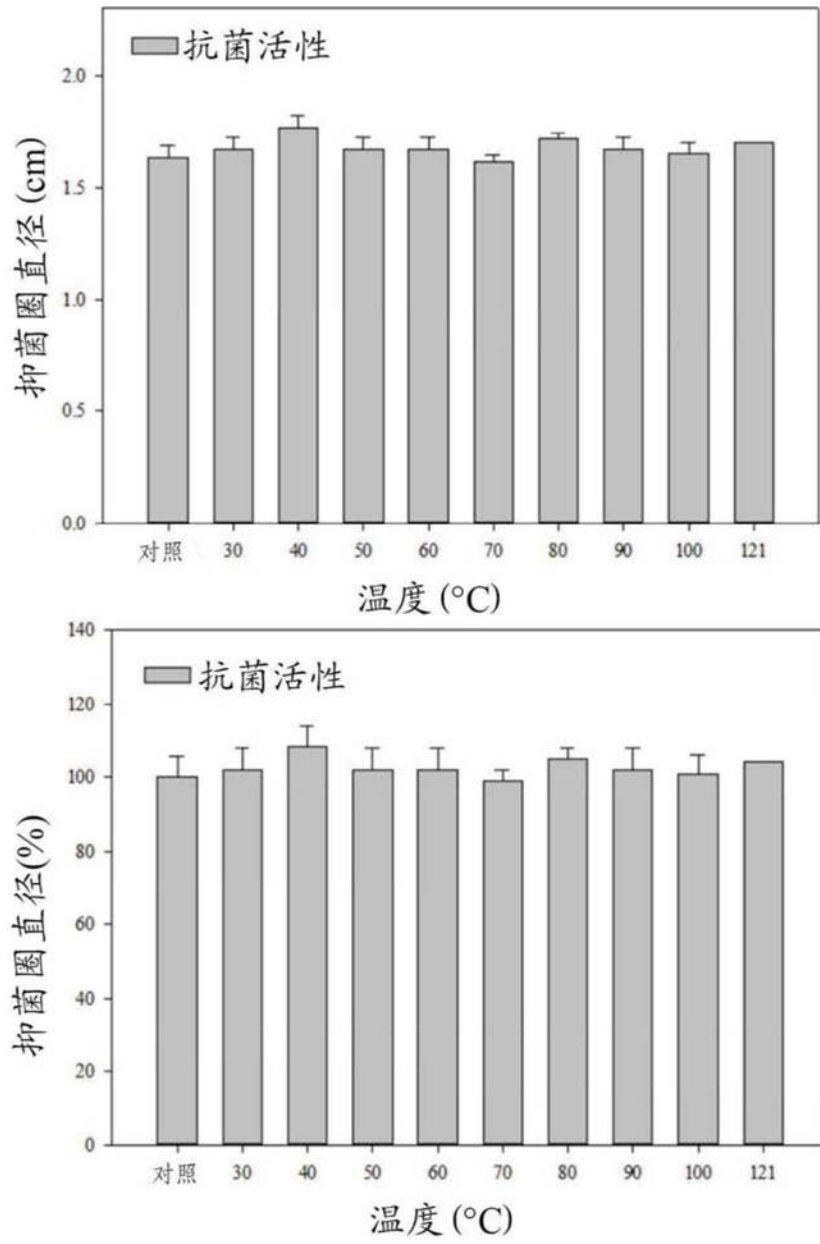


图8

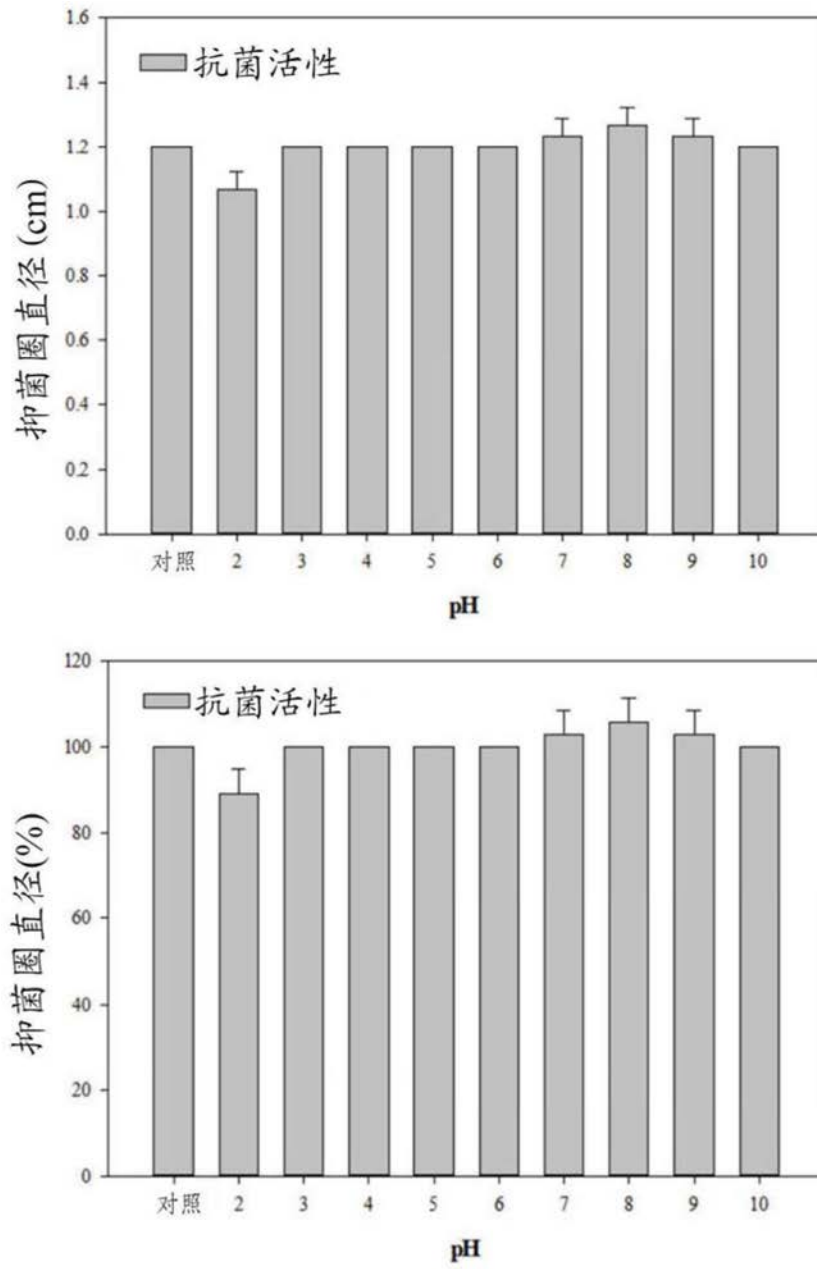


图9



图10

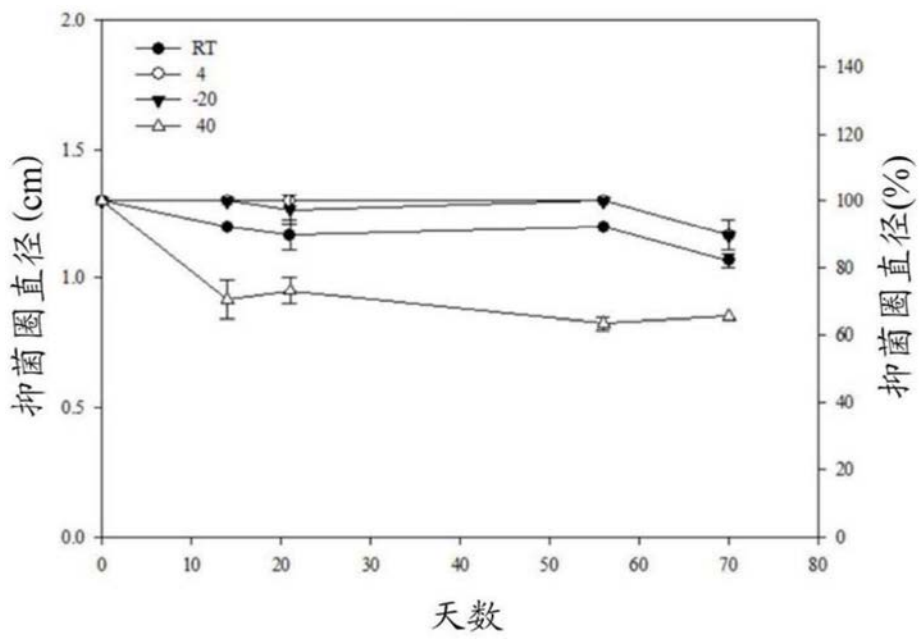


图11

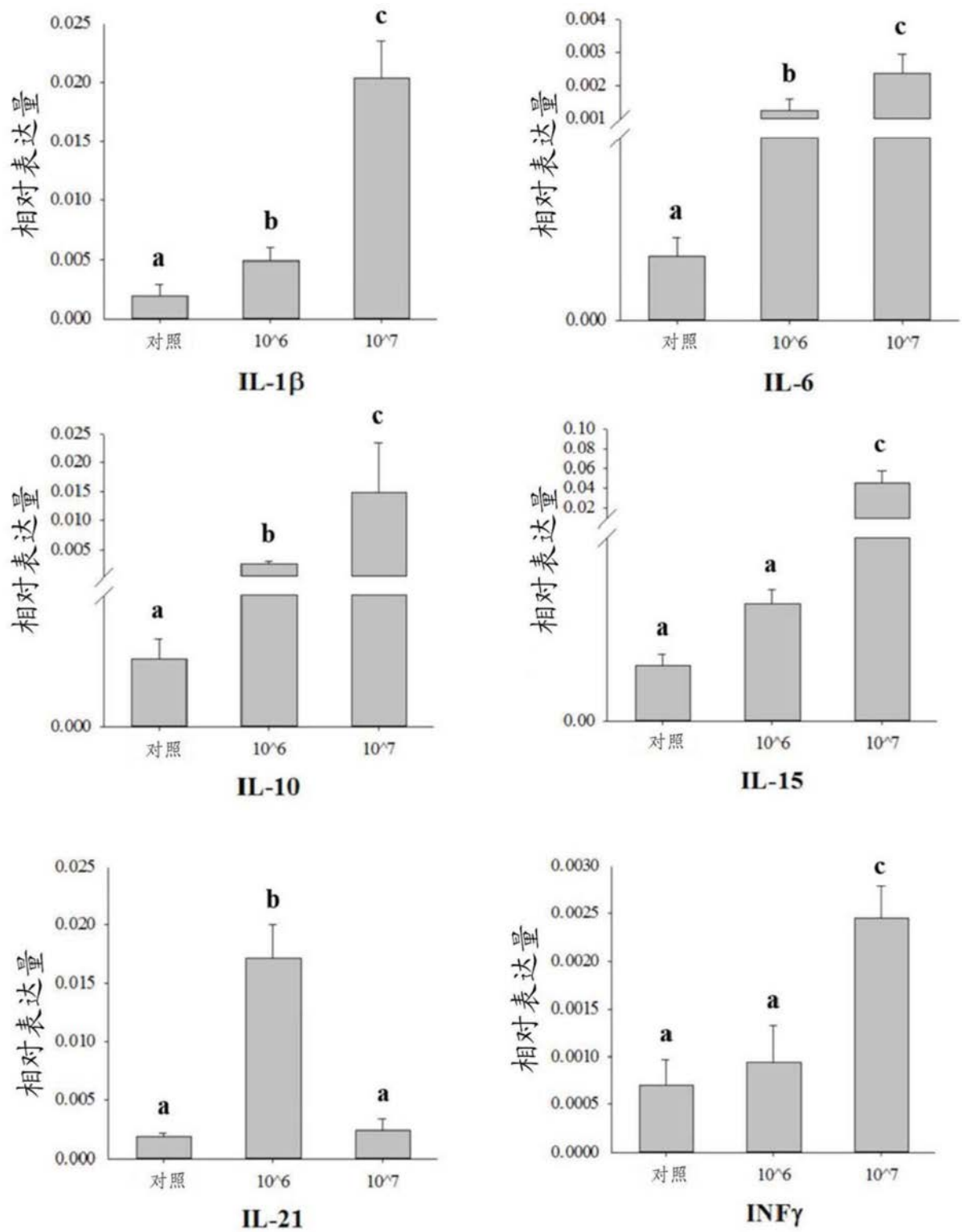


图12

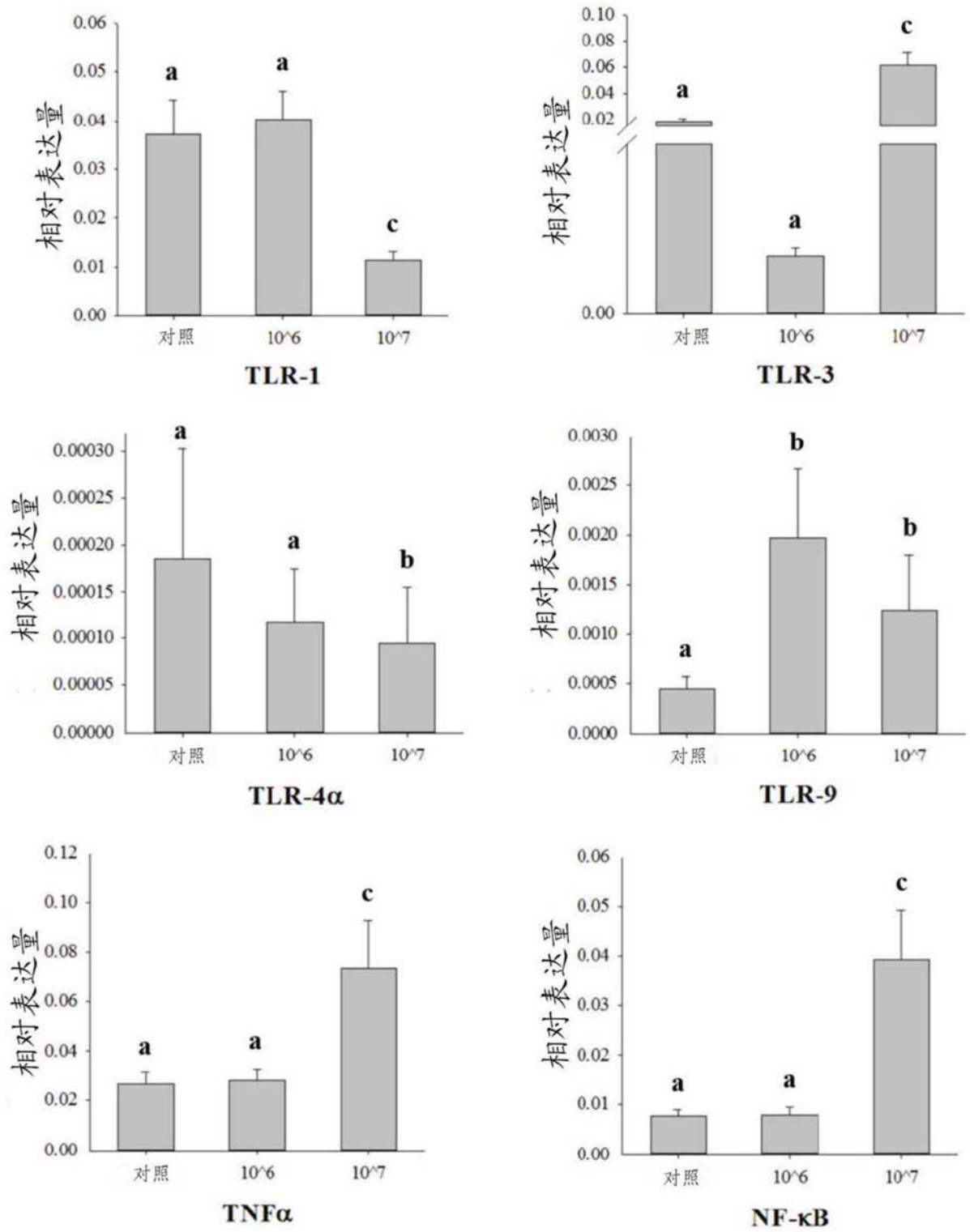


图13

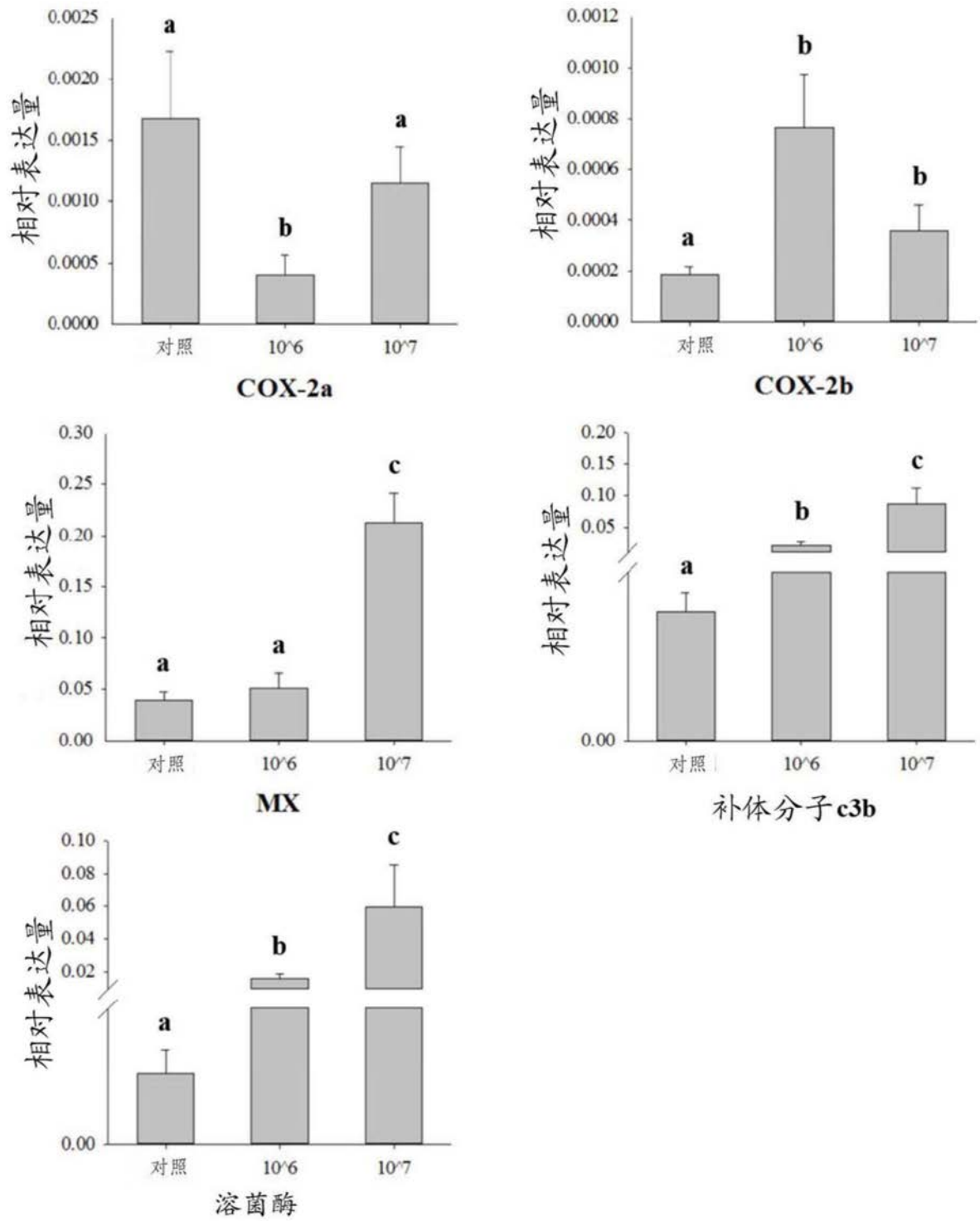


图14

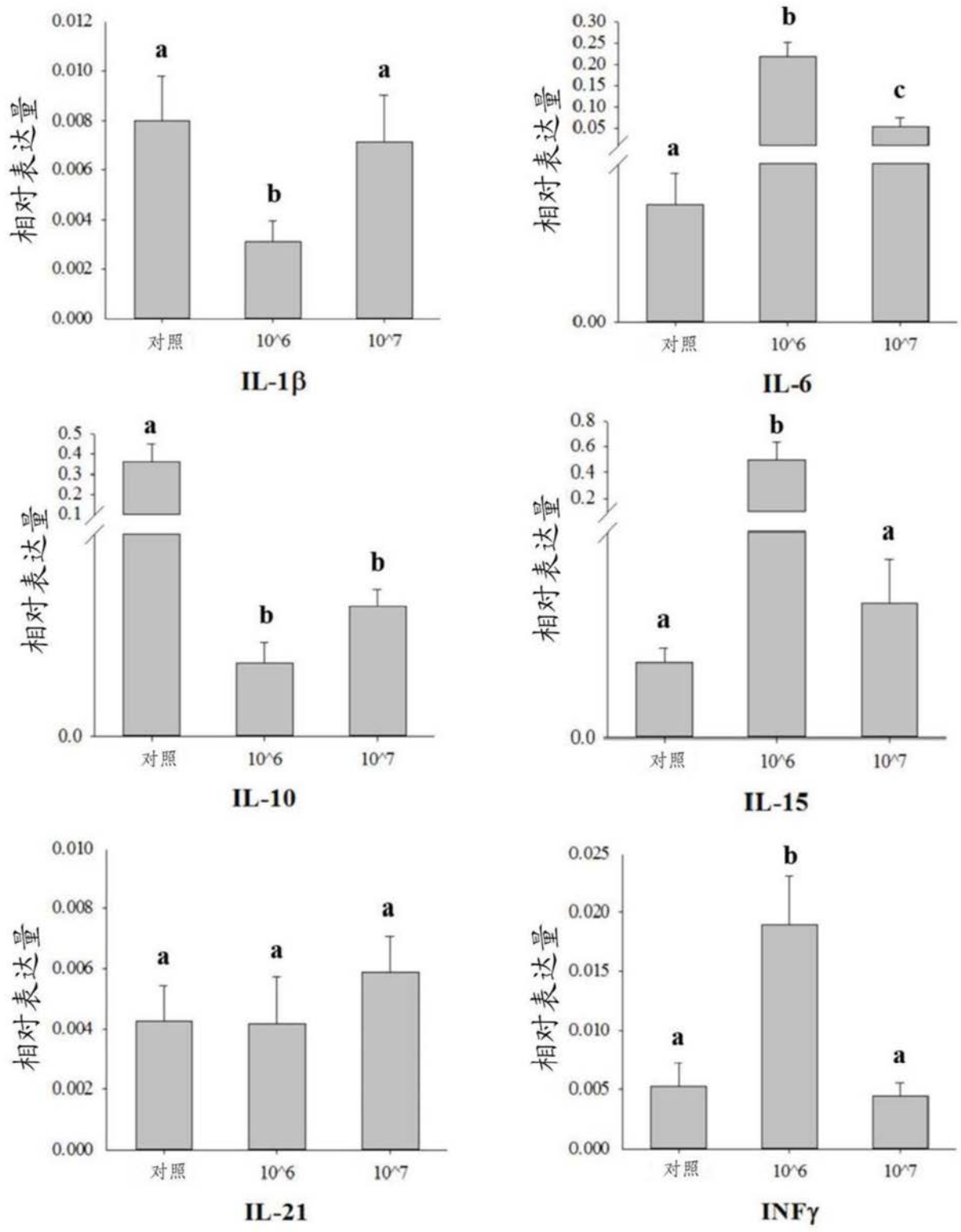


图15

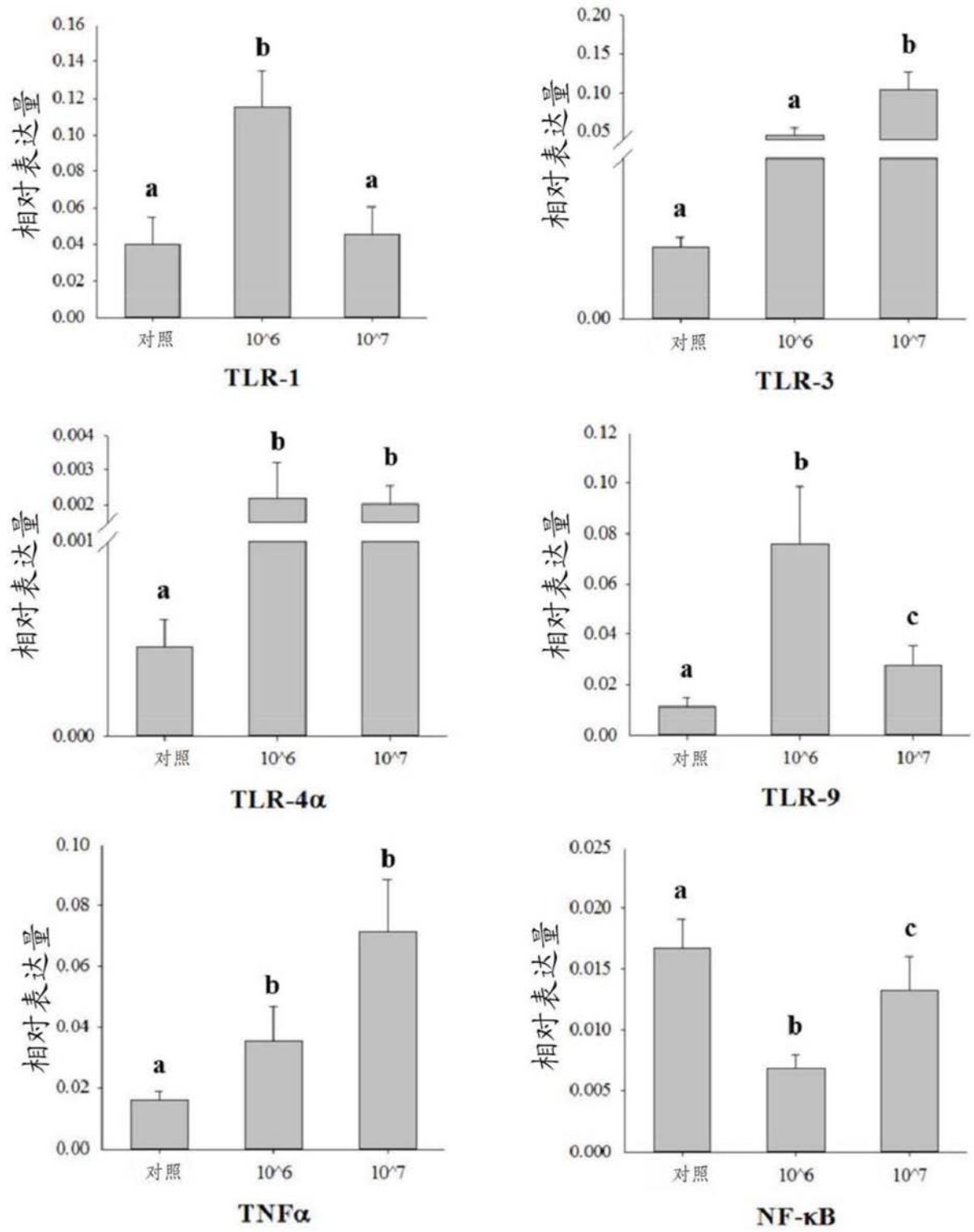


图16

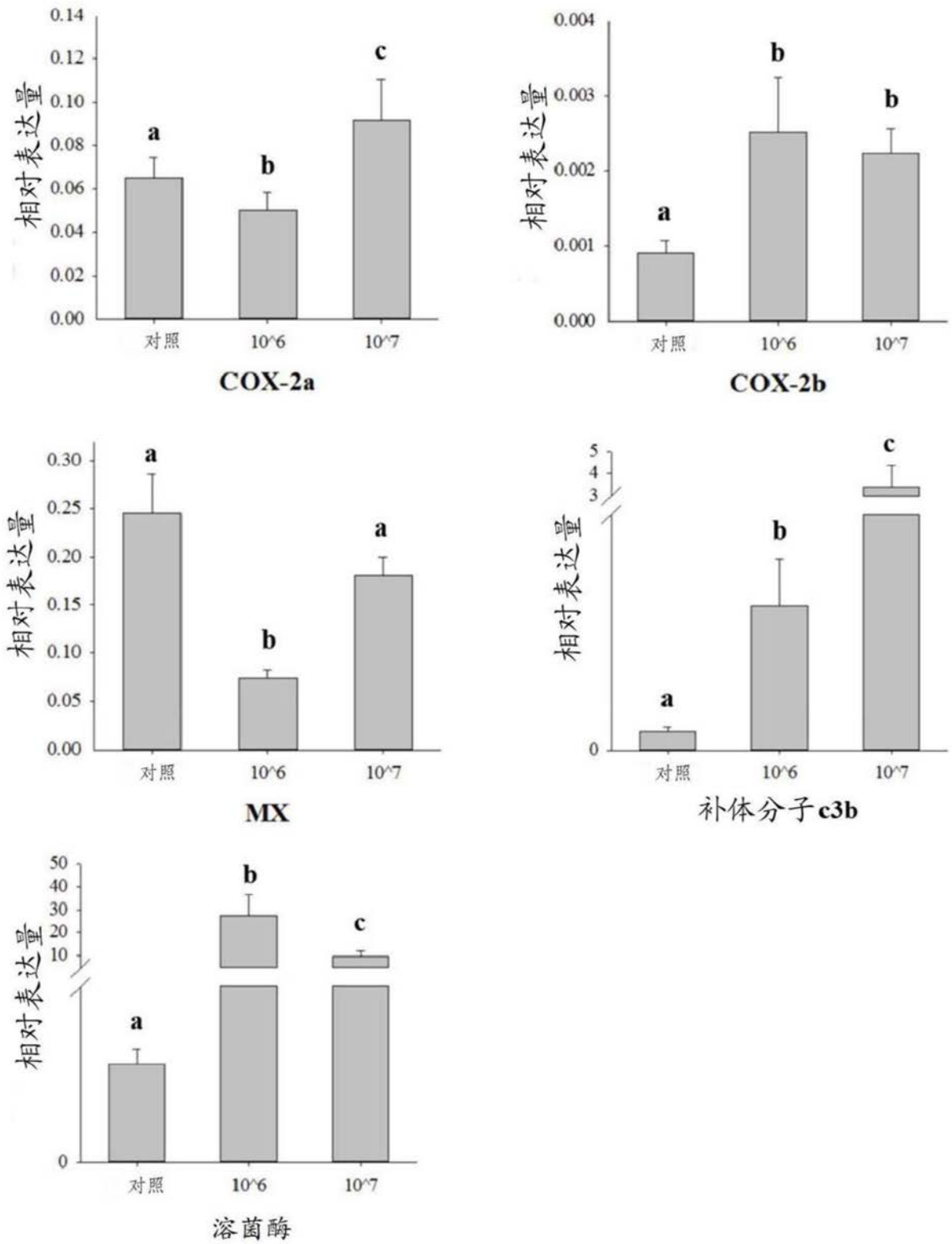


图17

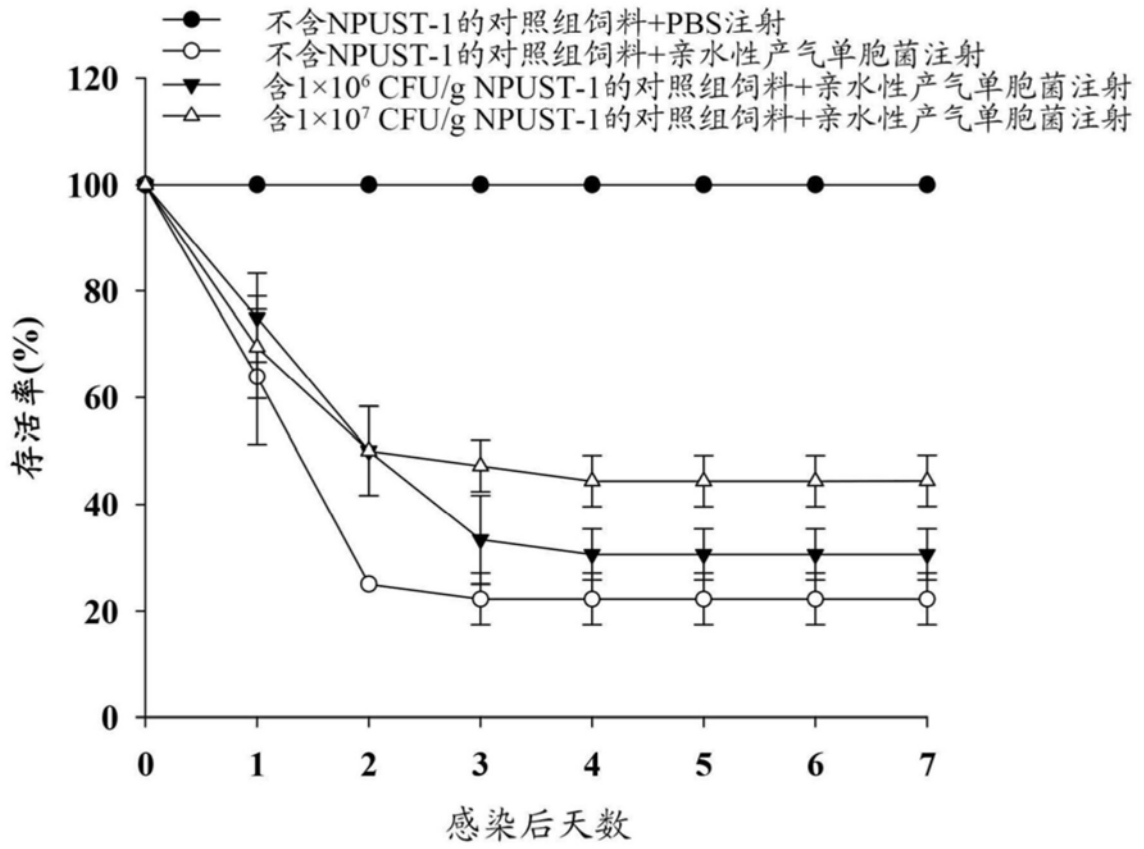


图18

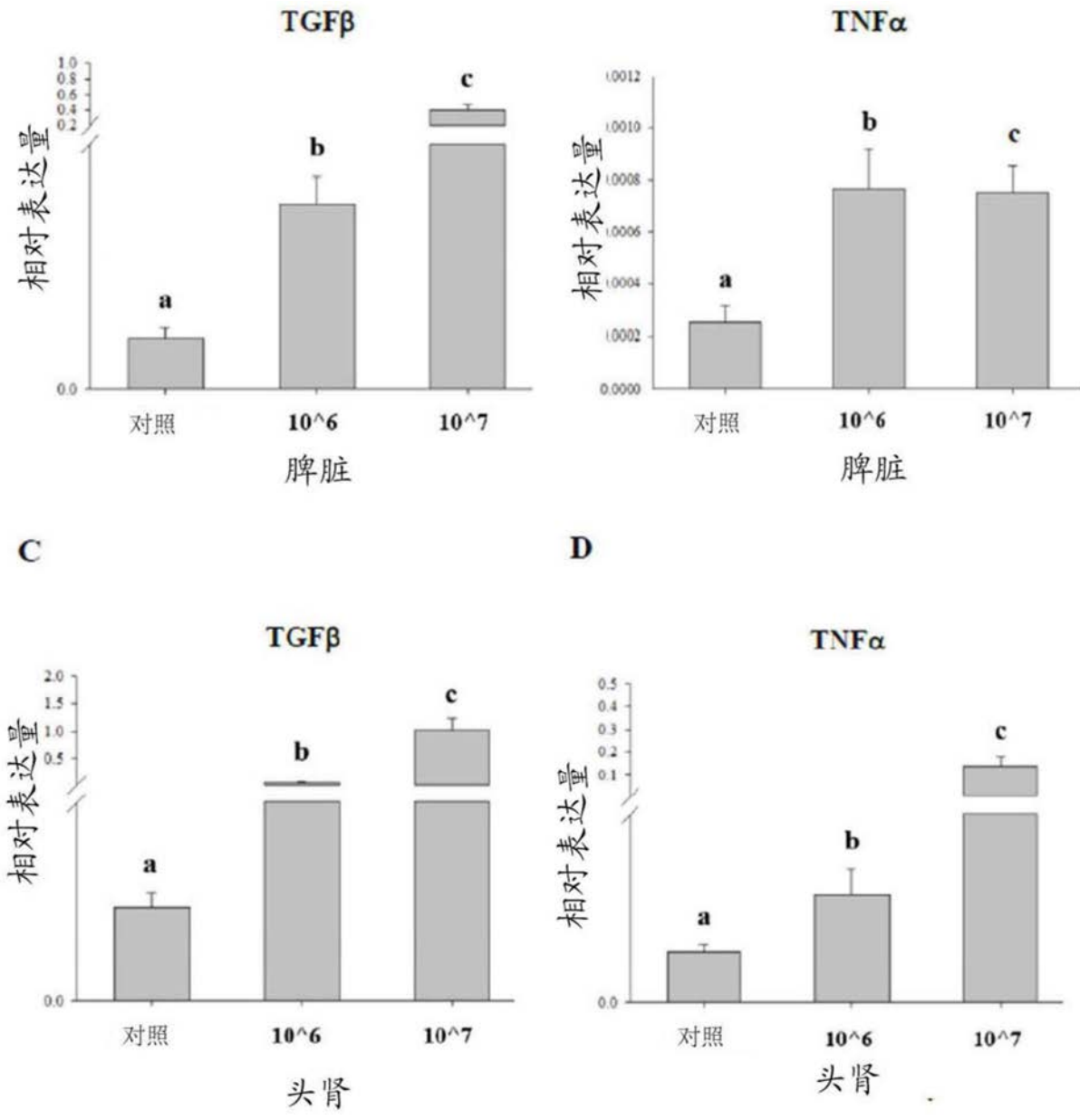


图19

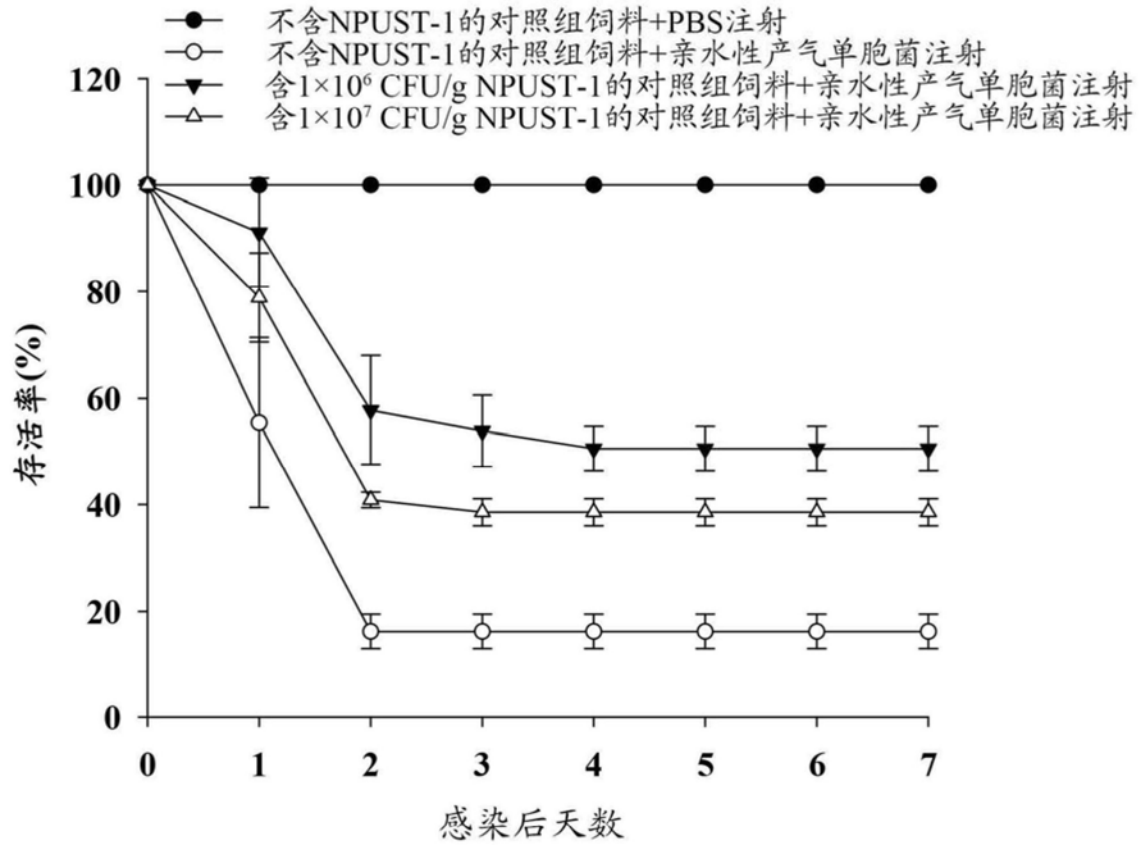


图20

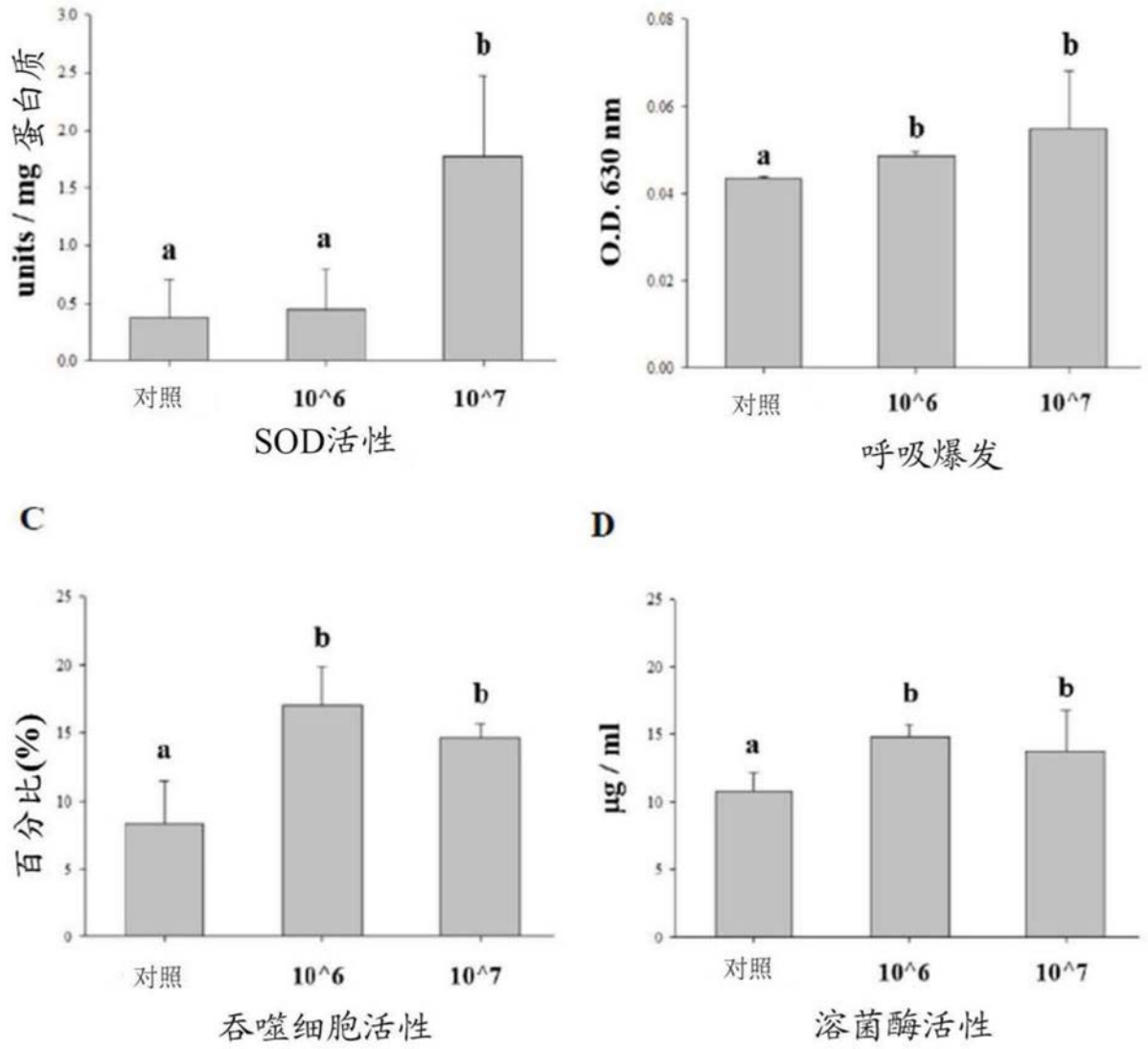


图21