

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(7):941-947; 4 July 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 坚强芽胞杆菌主要分泌蛋白的鉴定及其分泌性序列

刘笋<sup>1,2</sup>, 宋晓玲<sup>1</sup>, 黄捷<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 2660711

<sup>2</sup> 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:**【目的】坚强芽胞杆菌是一种在自然界普遍存在的益生菌, 在对虾养殖中应用较为广泛。为了研究其分泌性蛋白从而为分泌性载体的构建提供理论依据, 本文对坚强芽胞杆菌的主要分泌蛋白进行质谱鉴定及分泌性序列的分析。【方法】从本实验室分离保存的 1 株来自对虾肠道的坚强芽胞杆菌 (*Bacillus firmus*) 培养液中获取了分泌性蛋白, 进行 SDS-PAGE, 并对表达量较高的 3 条蛋白区带进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定及克隆测序, 进行生物信息学分析。【结果】鉴定出的蛋白分别是坚强芽胞杆菌几丁质酶 (chitinase)、坚强芽胞杆菌肠毒素 A (enterotoxin A) 和坚强芽胞杆菌 BCG9842 蛋白 (hypothetical protein BCG9842)。经在线软件 SignalP 3.0 分析, 确定 chitinase、enterotoxin 和 BCG9842 均存在不同的分泌性信号肽序列 bf-43、bf-37 和 bf-16, 通过在线软件 PSORT 分析表明, bf-43 定位于细胞的外膜上, bf-37 和 bf-16 定位于细胞的胞外。【结论】本研究鉴定出了坚强芽胞杆菌的 3 个主要分泌性蛋白, 分析筛选出了 3 条分泌性序列, 为分泌性载体的构建提供理论依据。

**关键词:** 坚强芽胞杆菌, 分泌性蛋白, MALDI-TOF/TOF 质谱分析, 克隆, 分泌性序列, 细胞定位

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 07-0941-07

目前, 在水产养殖中应用益生菌日益受到重视并取得显著效果<sup>[1-4]</sup>。在对虾养殖过程中益生菌的研究报道比较多, 多侧重于应用交替假单胞菌<sup>[5]</sup>、假单胞菌<sup>[6]</sup>和光合细菌等控制病害或改善水质方面。坚强芽胞杆菌是一种常见的益生菌, 在自然界中普遍存在, 对人、畜和水产动物无害。近年来, 坚强芽胞杆菌在对虾养殖过程中的应用效果显著<sup>[7]</sup>, 研究多集中在一些蛋白的克隆纯化及生物信息学分析<sup>[8-10]</sup>, 有关坚强芽胞杆菌分泌性蛋白的研究还鲜有报道。

分泌性蛋白参与众多的生理过程, 包括细菌外壁的生物发育及能量的产生、有害物质的清理和脱

毒、信号转导等过程<sup>[11-13]</sup>。利用分泌性蛋白的特征, 进行鱼虾类疫苗抗原的表达与分泌, 可能为疫苗的导入提供有效途径。对未知的分泌性蛋白的研究, 多采用质谱鉴定的方法进行详细生物信息的获取。肽和蛋白质的质谱序列测定的优点是最低的耗样量和高速率, 因此在近年来得到了越来越多的关注, 成为极具潜力的新手段, 对高速发展的分子生物学的研究及生物奥秘的探索具有非常重要的意义<sup>[15-16]</sup>。

本研究从坚强芽胞杆菌分泌的胞外产物中, 通过质谱分析鉴定蛋白的序列, 并进行分泌性序列的筛选及生物信息学分析, 以便为分泌性载体的构建

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项和现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-46)

\* 通信作者。Tel: +86-532-85823062; Fax: +86-532-85823062; E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

作者简介: 刘笋 (1987-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事水产病害研究。E-mail: xqyyxz2005@163.com

收稿日期: 2011-01-16; 修回日期: 2011-03-23

提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**坚强芽胞杆菌 (*Bacillus firmus*) ,编号 PC070465 2007 年 4 月分离自山东昌邑。菌株为本实验室分离鉴定,于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存<sup>[17]</sup>。使用前采用平板划线的方法进行活化。

**1.1.2 细菌培养及分泌性蛋白的制备:**挑取单菌落至 10 mL 液体 2216E 培养基 (0.1% 酵母提取物, 0.5% 蛋白胨, 0.001%  $\text{FePO}_4$ ) 中,  $28^{\circ}\text{C}$  , 220 r/min 震荡培养 24 h。培养物于  $4^{\circ}\text{C}$  3200  $\times$  g 离心 10 min, 收集上清液, 再分别用 0.45  $\mu\text{m}$  和 0.20  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。然后将滤液用截流 10 kDa 的超滤管 (MILLIPORE)  $4^{\circ}\text{C}$  3200  $\times$  g 离心超滤 30 min。使液体由 10 mL 浓缩到 1 mL。浓缩滤液于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。采用 Bradford 法<sup>[18]</sup> 及电泳扫描法, 测定波长为 595 nm 时不同浓度的标准蛋白的光密度值, 绘制标准曲线, 计算总蛋白含量。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**PCR 克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶、Taq 酶、连接酶等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 质粒小量提取试剂盒购自 OMAGE 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自 ZYMO RESEARCH 公司; *E. coli* DH5 $\alpha$  购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 酵母浸出物、蛋白胨等购自 OXOID 公司。Varioskan Flash 光栅式多功能读数仪 (Thermo Fisher 公司)。

### 1.2 分泌性蛋白 SDS-PAGE

根据测得的蛋白浓度, 取 10  $\mu\text{L}$  分泌性蛋白浓缩物进行 SDS-PAGE, 采用 5% 浓缩胶, 15% 分离胶, Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液 (250 mmol/L 甘氨酸, 25 mmol/L Tris, 0.1% SDS, pH8.3), 120 V 电泳约 2.5 h。

### 1.3 主要分泌性蛋白区带的质谱分析

分泌性蛋白经 SDS-PAGE 后, 从凝胶上切下表达量相对较高的主要蛋白条带, 送上海博苑科技有限公司进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析, 通过 MATRIX SCIENCE 在线比对鉴定。

### 1.4 基因克隆及序列测定

根据质谱分析鉴定出的坚强芽胞杆菌 (*Bacillus firmus*) 几丁质酶、肠毒素 A 蛋白和 BCG9842 蛋白序

列, 采用 Primer premier 5.0, 设计了 3 对引物 P1、P2 和 P3, 其中 P1 用于扩增几丁质酶基因, P2 用于扩增肠毒素 A 蛋白基因, P3 用于扩增 BCG9842 蛋白基因。所有引物送交上海生工有限公司合成。

表 1 设计的引物序列

Table 1 The sequences of primers

Primer	Codon	Sequence (5'→3')
P1	P1-F	TTTACATCGAAGCCCACAT
	P1-R	GCATCAAAGCCCATTATC
P2	P2-F	AATAGTTGCTAATACATAGGAGGAG
	P2-R	TACTGCCATAAGTGCTGATAGAG
P3	P3-F	GGGATGGTTATATGTTGAAGA
	P3-R	TGAATGAGAGAATAGTGGTTTG

提取坚强芽胞杆菌的基因组 DNA, 作为 PCR 反应的模板。采用紫外分光光度法和琼脂糖电泳法测定模板 DNA 浓度, 按照常规方法进行 PCR 反应。25  $\mu\text{L}$  反应体系包含 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 0.025 mmol/L; 正向和反向引物浓度各 40 pmol; Ex Taq DNA 聚合酶 (宝生物) 1.25 U, 按以下程序进行 PCR 扩增:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min 变性后进行 35 个在  $94^{\circ}\text{C}$  40 s、退火 (退火温度分别为  $49.7^{\circ}\text{C}$  35 个循环、 $48.6^{\circ}\text{C}$  35 个循环、 $48.7^{\circ}\text{C}$  35 个循环) 40 s、 $72^{\circ}\text{C}$  90 s 的循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, PCR 结束后, 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶回收试剂盒 (ZYMO) 回收 PCR 产物。

将回收的 PCR 扩增片段与 pGM-T 载体 (天根) 进行连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞 (天根), 涂布于含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 待菌落长出后, 挑取白色菌落进行 PCR 筛选出重组菌。将重组菌接种于含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基上,  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜, 提取重组质粒, 送上海生工生物有限公司进行序列测定。

### 1.5 分泌性信号肽序列的生物信息学分析

对所测定的序列用信号肽预测软件 SignalP3.0<sup>[19]</sup> (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 选择革兰氏阳性细菌的方法, 进行在线信号肽预测。进一步对信号肽分泌序列用细胞定位分析预测软件 PSORT<sup>[20-21]</sup> (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 选择革兰氏阳性细菌的方法, 进行在线细胞定位分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 坚强芽胞杆菌胞外蛋白的 SDS-PAGE

坚强芽胞杆菌胞外蛋白经超滤浓缩后进行 SDS-PAGE (图 1), 结果表明, 在坚强芽胞杆菌的胞外产物中, 有很多蛋白条带, 但是表达量不同。经图像分析软件分析发现, 表达量相对比较高的是 43、37 和 16 kDa 蛋白。

### 2.2 主要分泌性蛋白的质谱分析

将胞外产物的 SDS-PAGE 中表达量相对较高的蛋白带胶条切下, 送上海博苑生物科技有限公司进行 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定。

坚强芽胞杆菌的 43kDa 蛋白带的鉴定结果为几丁质酶 (putative chitinase)。其肽指纹图谱中有 3 条序列与几丁质酶相匹配 (表 2), 蛋白序列覆盖率约为 10%。

坚强芽胞杆菌的 37kDa 蛋白带鉴定结果为肠毒素 A (enterotoxin A)。其肽指纹图谱中有 13 条序列与肠毒素 A 相匹配 (表 3), 蛋白序列覆盖率约为 49%。

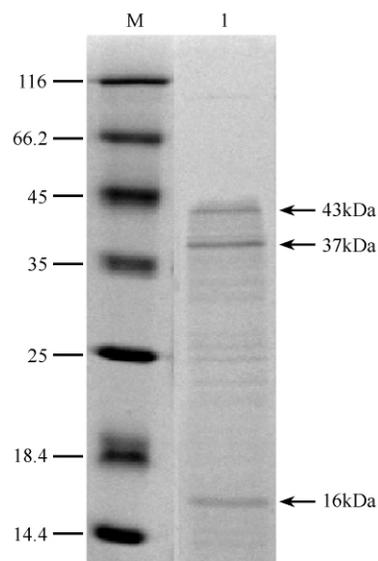


图 1 坚强芽胞杆菌胞外蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of the extracellular products from *Bacillus firmus*. M: Protein molecular weight standards (MBI); 1: *Bacillus firmus*.

坚强芽胞杆菌的 16 kDa 蛋白带鉴定结果为 BCG9842 蛋白 (hypothetical protein BCG9842\_B2512)。其肽指纹图谱中有 7 条序列与 BCG9842 蛋白相匹配 (表 4), 蛋白序列覆盖率约为 39%。

表 2 坚强芽胞杆菌 43 kDa 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Sequence
135	141	1010.4951	1009.4878	1009.5021	K. WHYIYITK. K
153	175	2432.1462	2431.1389	2431.1517	R. ADFEPIGTVQHDGSAASNHLTHK. I
257	273	1901.9253	1900.9180	1900.9353	R. NGEMIDTVTGPHFIDKK. L

Note: Top Score:166 for gi|196041711|putative chitinase[*Bacillus cereus* NVH0597-99].

表 3 坚强芽胞杆菌 37kDa 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Sequence
76	87	1329.6224	1328.6151	1328.6507	K. VNAMSSLTNHQK. F
95	103	1193.5149	1192.5076	1192.5400	R. EWIDEYNPK. L
104	113	1262.5925	1261.5852	1261.6158	K. LIDLNQEMMR. Y
118	124	908.3899	907.3827	907.4076	R. FNSYYSK. L
125	139	1692.7607	1691.7534	1691.8002	K. LYELAGNVNEDEQAK. A
140	148	986.4321	985.4249	985.4505	K. ADFTNAYGK. L
149	169	2514.2388	2513.2315	2513.2795	K. LQLVQSIQESMEQDLELNR. F
209	229	2407.2991	2406.2918	2406.3482	R. IQGEIQAELTILNRPQEHK. G
237	249	1479.7478	1478.7405	1478.7729	K. QVFTITNQTATK. T
250	272	2451.1863	2450.1790	2450.2289	K. TIDFVSIGTSLSEIVNAADSQTR. E
282	291	1209.7240	1208.7167	1208.7492	K. QKELLPLIQK. L
292	318	3084.4390	3083.4317	3083.4935	K. LSQTEAEATQIFVEDQVNSFTELIDR. Q
372	386	1822.7765	1821.7692	1821.8170	K. QTNQFEDYVTNVEVH.

Note: Top Score:1039 for gi|196041193|enterotoxin A[*Bacillus cereus* NVH0597-99].

表4 坚强芽胞杆菌 16kDa 蛋白质谱分析中基本信息和匹配的肽段序列

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Sequence
173	179	876.42	875.42	875.39	K. HADWY GK. T
131	139	1088.56	1087.55	1087.50	K. NLPSSW NDR. I
180	190	1258.63	1257.62	1257.60	K. TANLAPEW NDK. T
57	67	1301.69	1300.68	1300.74	K. KDIQYITM VLPK. Q
119	130	1392.69	1391.69	1391.65	K. GGQYIYWSSGFK. N
140	167	2933.50	2932.50	2932.37	R. ISSVSTASPSASYSTLWEHTSTQGYGK. G

Note: Top Score: 101 for gi|218897794, hypothetical protein BCG9842\_B2512 [*Bacillus cereus* G9842]

### 2.3 主要分泌性蛋白编码序列的克隆与鉴定

根据各蛋白的核苷酸序列,预测 PCR 所扩增的基因片段大小分别应 1464、1273、1000bp 左右。PCR 结果表明,各基因扩增的结果都比较好,可进行大量扩增,将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示,扩增出的片段大小与预测大小一致。

将 PCR 筛选阳性克隆,少量抽提重组质粒,重组质粒经酶切后进一步证明是阳性后,将阳性的重组质粒进行测序,测序结果表明所有开放阅读框的碱基与目的序列完全相同,证实克隆到载体 pGM-T 上的外源 DNA 片段为坚强芽胞杆菌的几丁质酶

基因、肠毒素 A 基因及 BCG9842 蛋白基因。可对测序的蛋白序列进行下一步的分析。

### 2.4 要分泌性蛋白信号肽序列及细胞定位的预测

对测序的蛋白序列用在线信号肽预测软件 SignalP3.0 对全部的氨基酸序列进行信号肽预测,按照实验方法中的步骤所述,软件分析发现,测序的 3 种蛋白的氨基酸序列都带有明显的信号肽序列。按照其蛋白的来源,将这 3 条分泌序列分别命名为 bf-43、bf-37 和 bf-16。其中,信号肽的长度都在 15 - 40 氨基酸之间,且都位于分泌性序列的 N 端(表 5)。

表5 坚强芽胞杆菌的主要分泌性蛋白的分泌序列

Table 5 Major secreted protein sequences of *Bacillus firmus*

Strain	Protein/kDa	Sequences of signal peptide
<i>Bacillus firmus</i>	43	<u>MNNRLLKQLQNMKMNKSLG</u> AVALTAGHGTTLIPQNTYAHGFVE
<i>Bacillus firmus</i>	37	<u>MKKTLITGLLVTAVSTSCFI</u> PVSAYAKEGQTEVKTVYAQNVIAPN
<i>Bacillus firmus</i>	16	<u>MLKKLVAGTLVAGFALTGGLGAVSAE</u> EKSNTIKSFDYLKVDQNV

Note: N-terminal signal peptide of 45 amino acids and their signal regionals (Underlined part of the amino acid sequence)

对分析筛选出的分泌序列进行细胞定位的分析,用在线细胞定位分析预测软件 PSORT,进行蛋白位置的分析预测。分析发现,来源于革兰氏阳性菌坚强芽胞杆菌的 bf-43 定位在细胞膜上,bf-37 和 bf-16 定位在细胞外(表 6)。

表6 分析筛选出的 3 个分泌序列的细胞定位分析结果

Table 6 Cellular localization of the 3 selected secretory sequences

Source strain	Protein	Signal peptide	Predicted subcellular location	Reliability score
<i>Bacillus firmus</i>	bf-43	+	Membrane	0.174
<i>Bacillus firmus</i>	bf-37	+	Outside	0.300
<i>Bacillus firmus</i>	bf-16	+	Outside	0.300

## 3 讨论

对坚强芽胞杆菌主要分泌性蛋白进行获取纯化后,分别得到了表达量相对较高的 43、37 和 16 kDa

蛋白,质谱鉴定的结果表明分别为蜡样芽胞杆菌的几丁质酶,蜡样芽胞杆菌的肠毒素 A 和蜡样芽胞杆菌的 BCG9842 蛋白。根据质谱鉴定的蛋白的序列设计引物,用坚强芽胞杆菌的基因组 DNA 做模板,扩增了几丁质酶基因,肠毒素基因和 BCG9842 蛋白基因并对克隆的基因片段进行了测序。

本实验中分析筛选出了 3 条分泌性序列,利用 SignalP3.0 分析这 3 个序列发现,这些基因都带有明显的信号肽序列,说明不管是革兰氏阳性细菌还是阴性细菌,其分泌性蛋白的转运大都依赖于信号肽的存在<sup>[22-23]</sup>。而利用 PSORT 软件分析其在细胞中的定位不同:革兰氏阳性菌中胞浆膜的外面是一层厚厚的肽聚糖层,分泌蛋白都是定位在外膜上或是分泌到细胞外,这也和之前的文献

报道一致<sup>[24]</sup>。其中, bf-37 和 bf-46 就是分泌到细胞外的分泌性蛋白, 这两个蛋白的信号肽对于分泌性重组疫苗载体的构建应该有更佳的实用效果。

分泌性蛋白是目前水产动物病害防治研究的热点和难点<sup>[25]</sup>, 也是极具挑战性的研究领域。本研究中鉴定出的坚强芽胞杆菌的 3 种分泌性蛋白, 对其性质功能的研究还鲜有报道, 但在芽胞杆菌属的其它菌种中却有很多报道。其中, 以对苏云金芽胞杆菌的几丁质酶、肠毒素的研究居多<sup>[26-27]</sup>, 这为我们进一步研究坚强芽胞杆菌的分泌性蛋白提供了很好的思路 and 参考。全面系统的研究分泌性蛋白不仅有助于全面认识、分析和解释各种生理和病理现象, 而且也为新药的开发提供更多的选择。运用 DNA 重组技术在细菌等微生物中分泌具有某些有应用前景的生物活性物质已经在免疫和生物技术等领域得到了广泛的应用。而应用分泌性序列构建具有高量表达的分泌性载体也就具有了重要的意义。

对于分泌性序列的筛选, 大多数研究采用基因工程捕获的策略进行<sup>[28-29]</sup>, 这种方法工作量很大且假阳性率较高。本实验从高表达的分泌性蛋白的获取入手, 经过质谱鉴定、分泌序列的筛选分析及细胞定位分析后, 筛选出了可用于目的菌株分泌性载体构建的分泌性序列, 对于分泌性表达载体所需的信号肽序列的筛选, 这是一种快速高效的方法。从而为应用分泌性序列构建具有高量表达的分泌性载体提供了可靠的理论和方法依据。

由于现阶段的研究中还没有找到合适的可以在坚强芽胞杆菌中复制表达的载体质粒, 我们的实验结果为构建坚强芽胞杆菌的分泌性表达载体提供了理论基础, 在下一步的研究中我们将在此研究结果的基础上制备以坚强芽胞杆菌等益生菌为抗原载体的活疫苗, 让其在水产动物体内长期定植并表达抗原, 达到预防病害及减少抗生素等化学药物的使用的目的, 为水产养殖业的病害防治提供新的思路 and 选择。

## 参考文献

- [1] 李海兵, 宋晓玲, 韦嵩, 李赞, 兰萍. 4 株对虾肠道益生菌的筛选和鉴定. 海洋与湖沼 (*Oceanologia et Limnologia Sinica*) 2008, 39(4): 374-380.
- [2] 胡毅, 谭北平, 麦康森, 艾庆辉, 郑石轩, 陈开敏. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. 中国水产科学 (*Journal of Fishery of China*) 2008, 15(2): 244-251.
- [3] 林黑着, 李卓佳, 郭志勋, 冯娟, 文国樑, 丁贤. 益生菌对凡纳滨对虾生长和全虾营养组成的影响. 南方水产 (*South China Fisheries Science*) 2008, 4(6): 95-100.
- [4] 张汉华, 李卓佳, 郭志勋, 曹煜成, 贾晓平. 益生菌对海水虾池浮游生物的生态调控效果研究. 海洋科学 (*Marine Sciences*) 2009, 33(1): 12-20.
- [5] Abraham TJ. Antibacterial marine bacterium deterring luminous vibriosis in shrimp larvae. *NAGA. World Fish Center Quarterly*, 2004, 27(3): 28-31.
- [6] Chythanya R, Karunasagar Indrani, Karunasagar Iddya. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 2002, 208: 1-10.
- [7] 温崇庆, 何红, 薛明, 刘慧玲, 周世宁. 坚强芽胞杆菌对凡纳滨对虾幼体变态的影响. 热带海洋学报 (*Journal of Tropical Oceanography*) 2006, 25(2): 54-58.
- [8] Chung Fai Keung, Feng Guo, Peiyuan Qian, Wen-Xiong Wang. Influences of metal-ligand complexes on the cadmium and zinc biokinetics in the marine bacterium, *Bacillus firmus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1): 131-137.
- [9] Cristiane Moriwaki, Glauciane L. Costa, Rubia Pazzetto, Gisella M. Zanin, Flavio F. Moraes b, Marcia Portilho a, Graciete Matioli. Production and characterization of a new cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* isolated from Brazilian soil. *Process Biochemistry*, 2007, 42(10): 1384-1390.
- [10] V. Jaitak, V. Kumar Kaul, Bandna, N. Kumar, B. Singh, L. S. Savergave, V. V. Jogdand, S. Nene. Simple and efficient enzymatic transglycosylation of stevioside by  $\beta$ -cyclodextrin glucanotransferase from

- Bacillus firmus. *Biotechnology Letters*, 2009, 31: 1415-1420.
- [11] 葛圣雷, 陈主初, 肖志强, 谢鼎华. 分泌性蛋白的研究策略. *生命的化学 (Chemistry of Life)*, 2005, 25(6): 476-477.
- [12] 孙强, 韩骅. 分泌蛋白特异性基因缺陷的设计与验证. *生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 2004, 31(4): 328-333.
- [13] Zhang WW, Sun L. Cloning, characterization and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 2825-2831.
- [14] Gurusahai Khalsa-Moyers, William Hayes McDonald. Developments in mass spectrometry for the analysis of complex protein mixtures. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2006, 5(2): 98-111.
- [15] Shama P. Mirza, Brian D. Halligan, Andrew S. Greene, Michael Olivier. Improved method for the analysis of membrane proteins by mass spectrometry. *Physiological Genomics*, 2007, 30: 89-94.
- [16] Anne-Claude Gingras, Ruedi Aebersold, Brian Raught. Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *The Journal of Physiology*, 2005, 563(1): 11-21.
- [17] 刘君. 对虾抗白斑综合症病毒功能菌株的筛选及其作用效果的评价. 中国海洋大学硕士学位论文. 2010.
- [18] Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston. 精编分子生物学实验指南. 金由辛, 等译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [19] Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijine, Soren Brunak. Improved prediction of signal peptides-SignaIP3.0. *Journal of Molecular Biology*, to appear 2004.
- [20] 孙强, 王冀妹, 李荣, 周鹏, 黄红艳, 韩骅. *suc2* 信号肽捕获系统的建立. *遗传学报 (Acta Genetica Sinica)*, 2001, 28(4): 379-384.
- [21] 孙强, 王冀妹, 陈萍, 柳天平, 牛利国, 韩骅, 苏成芝. *suc2* 基因的克隆及在酵母基因组中的定位突变. *第四军医大学学报 (Journal of the Fourth Military Medical University)*, 2000, 21(12): 1447-1450.
- [22] Robinson C, Bolhuis A. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 350.
- [23] Mori H, Ho K. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol*, 2001, 9: 494.
- [24] Poquet I, SD Ehrlich, A Gruss. An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 1904-1912.
- [25] Lee KK, Chen YL, Liu P C. Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* affected by *vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. *Blood Cell Molecules and Diseases*, 1999, 25(13): 180-192.
- [26] 卢伟, 蔡峻, 陈月华. 苏云金芽胞杆菌几丁质酶的研究进展. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34(1): 143-147.
- [27] 黄必旺, 黄志鹏, 关雄. 苏云金芽胞杆菌肠毒素的研究进展. *中国农业通报 (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 2008, 24(3): 292-295.
- [28] 张奉学, 于传信. 信号肽捕获——一种筛选分泌性和膜性蛋白的工具. *热带医学杂志 (Journal of Tropical Medicine)*, 2004, 4(4): 498-500.
- [29] William C. Skarnes, B. Anna Auerbach, Alexandra L. Joyner. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reporter is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes & Development*, 1992, 6: 903-918.

# Mass spectrometry identification of secreted proteins from *Bacillus firmus* and analysis of its secretive sequences

Sun Liu<sup>1 2</sup>, Xiaoling Song<sup>1</sup>, Jie Huang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

<sup>2</sup> Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** [Objective] *Bacillus firmus* was a common probiotics bacteria in nature and widely used in the shrimp aquaculture. In order to construct expression vectors for secretive proteins, we identified several major secretive proteins of *Bacillus firmus* by mass spectrometry and analyzed their gene sequences to find signal peptide sequences. [Methods] The secreted proteins of *Bacillus firmus* were extracted and separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The 3 highly expressed protein bands in the SDS-PAGE were identified by mass spectrometry Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)-Time of Flight (TOF) /Time of Flight (TOF) and the sequences were downloaded from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Then Polymerase Chain Reaction (PCR) primers were designed according to the downloaded sequences and specific DNA bands were amplified sequenced and bioinformatics analyzed. [Results] The proteins were identified as the putative chitinase, enterotoxin A and protein BCG9842 of *Bacillus firmus*. Three signal peptides were conformed by using the online software SignalP 3.0, namely bf-43, bf-37 and bf-16. The cellular localization of the secreted sequences were analyzed by PSORT. And we found that bf-43 located in the outer membrane of cells, bf-37 and bf-16 located in the extracellular cell. [Conclusion] 3 major secreted proteins of *Bacillus firmus* have been identified. 3 possible signal peptides were obtained and will be useful for the construction of expression vectors for secretive proteins.

**Keywords:** *Bacillus firmus*, secreted proteins, MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry, clone, secretive sequences

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest and the earmarked fund for Modern Agro-industry Technology Research System (nycytx-46)

\* Corresponding author. Tel: +86-532-85823062; Fax: +86-532-85823062; E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

Received: 16 January 2011 / Revised: 23 March 2011