

DOI:CNKI:61-1390/S. 20111021. 1641. 001

网络出版时间:2011-10-21 16:41

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61. 1390. S. 20111021. 1641. 001. html

枯草芽孢杆菌高效表达系统的构建

毕台飞¹,胡雄斌²,宋巍²,杨明明²

(¹ 榆林学院 生命科学学院,陕西 榆林 719000; ² 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】优化枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)启动子和表达宿主,构建其高效的表达系统,为重组枯草芽孢杆菌的研究和应用奠定基础。【方法】以 β -半乳糖苷酶编码基因为报告基因,以诱导型的枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵元启动子为调控元件、大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒为载体骨架,构建枯草芽孢杆菌高效表达载体 pGJ222,将其电转化到 *B. subtilis* 1A747 菌株后进行诱导表达试验和葡萄糖抑制试验。利用同源重组的方法,用枯草芽孢杆菌组成型启动子 P43 替换了 *B. subtilis* 野生型菌株 1A747 麦芽糖操纵元上游调控序列,得到优化重组表达宿主菌 *B. subtilis* BCYL,将 pGJ222 转入 *B. subtilis* BCYL 后,对优化的表达系统进行诱导表达试验和葡萄糖抑制试验。分别用 PCR 扩增大肠杆菌和枯草芽孢杆菌维生素 B₁₂ 合成前期途径的谷氨酰-tRNA 合成酶编码基因 *hemA*,构建其表达载体,并将其转化 *B. subtilis* BCYL 中进行诱导表达检测。【结果】成功构建了枯草芽孢杆菌高效表达载体 pGJ222,并实现了 β -半乳糖苷酶的高效表达,其表达量占总可溶性蛋白的 18%;质量分数 5%的麦芽糖诱导 24 h β -半乳糖苷酶活达到 16 U/mL。成功获得了优化重组表达宿主菌 *B. subtilis* BCYL,其可使 β -半乳糖苷酶活性有大幅度提高,在质量分数 5%麦芽糖诱导 24 h β -半乳糖苷酶活达到 21 U/mL,葡萄糖的抑制作用明显减弱。【结论】通过对启动子和表达宿主的优化,获得了枯草芽孢杆菌高效表达系统,为枯草芽孢杆菌基因工程研究提供了有力工具。

[关键词] 枯草芽孢杆菌;表达系统;同源重组; β -半乳糖苷酶

[中图分类号] Q789;S816. 73

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)11-0071-09

Construction of high-level expression system in *Bacillus subtilis*

BI Tai-fei¹, HU Xiong-bin², SONG Wei², YANG Ming-ming²

(¹ College of Life Science, Yulin College, Yulin, Shaanxi 719000, China; ² College of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】In order to facilitating the genetic manipulation in *Bacillus subtilis*, high-level expression system as efficient tool was developed in this study, in which the inducible promoter Pglv and expression host were reconstructed and optimized respectively. 【Method】The inducible maltose promoter and *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector were employed to construct the expression vector pGJ222, in which the *bgaB* coding for β -galactosidase was used as reporter. The pGJ222 was electro-transformed into *B. subtilis* 1A747 to examine the expression efficiency and repression caused by glucose. By means of homologous recombination, the expression host was reconstructed through replacement of maltose operon regulatory element by constitutive promoter P43 in chromosomal DNA of wild type *B. subtilis* strain 1A747, yielding *B. subtilis* BCYL. The resultant strain *B. subtilis* BCYL was transformed by pGJ222 and the improvement expression system was used to determine the expression efficiency and repression caused by glucose. In Another experiment, the *hemA* genes coding for glutamyl-tRNA synthetase, which involved in the synthesis

* [收稿日期] 2011-05-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30871813)

[作者简介] 毕台飞(1971—),男,陕西榆林人,副教授,主要从事应用微生物与饲料开发研究。

[通信作者] 杨明明(1971—),男,陕西略阳人,讲师,主要从事饲用微生物与生物技术研究。E-mail: biodna@126.com

pathway of vitamin B12, were PCR amplified and used to construct expression vectors. The resultant expression vectors were transformed into *B. subtilis* BCYL to examine expression efficiency. 【Result】 The high-level expression vector pGJ222 was successfully constructed in *B. subtilis* and the β -galactosidase driven by pGJ222 was successfully expressed in this study. SDS-PAGE showed that expression amount of β -galactosidase accounts for 18% of total soluble protein. The production β -galactosidase achieved 16 U/mL after induction (5% maltose) of 24 h. By means of the optimized host system *B. subtilis* BCYL, the production of β -galactosidase was improved and reached 21 U/mL after maltose induction of 24 h; meanwhile, the repression caused by glucose was significantly alleviated. 【Conclusion】 Thus, a high-level expression system was developed, which provides a potential tool for genetic engineering of *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*; expression system; homologous recombination; β -galactosidase

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是在工业发酵和微生物分子遗传学领域具有重要价值的革兰氏阳性菌^[1-2],目前利用能独立复制的质粒对该菌进行遗传改造,是构建枯草芽孢杆菌基因工程菌的重要方式。然而,因质粒稳定性差和表达调控元件启动子的强度低等限制因素,导致现有的枯草芽孢杆菌遗传操作系统并不完善^[3-6]。枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵元件启动子(*glv*)调控麦芽糖操纵元件基因*glvA*(编码 6-磷酸- α -葡萄糖苷酶)、*glvR*(编码调节蛋白 GLVR)和*glvC*(编码转运蛋白 GLVC)的表达^[7-9]。其中, GLVC 是磷酸烯酮式丙酮酸糖类磷酸转移酶系统(PTS)的组分,参与麦芽糖的转运及磷酸化; GLVR 和 6-磷酸麦芽糖结合可以促进*glv*启动子的转录;而葡萄糖通过代谢产物阻遏位点(*cre*)能反馈抑制*glv*启动子^[10-14]。*glv*启动子是一个诱导型的可控启动子,其诱导成本低,具有较好的应用前景。本试验选择在枯草芽孢杆菌中遗传稳定性较好的载体,以*cre*位点突变的*glv*启动子为调控元件构建表达载体,通过同源重组改造枯草芽孢杆菌宿主菌,缓解葡萄糖对目标基因表达的抑制,旨在获得枯草芽孢杆菌的高效表达系统,为重组枯草芽孢杆菌的研究与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 试验所用菌株有大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α (克隆宿主)和*B. subtilis* 1A747 菌株(原生型菌株),质粒有 pDL(含热稳定性 β -半乳糖苷酶基因(*bgaB*))、pGLVM1(含*glv*-M1 启动子的质粒)和 pDG1728(含*spec*抗性基因的整合载体),其中*B. subtilis* 1A747 菌株及质粒 pDG1728 和 pDL 由美国俄亥俄州立大学杆菌保藏中心(BG-SC)提供,其余质粒和菌种均由西北农林科技大学

动物营养与饲料科研平台实验室保存。

1.1.2 生化试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和基因组提取试剂盒购自 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、蛋白质分子质量标准(ASM0431)购自 MBI 公司, DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 OMEGA 公司, 地高辛标记试剂盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit, Cat # 1 093 657)购自 Roche 公司, 分析纯邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG, cat # N1127)、邻硝基苯酚(ONP, cat # 35966)和抗生素购自 Sigma 公司, Ni^{2+} 亲和树脂(Ni-NAT)购自 NOVAGE 公司, 葡萄糖测定试剂盒(G016-0120)购自上海名典生物有限公司。

1.1.3 引物及寡核苷酸序列 本试验所用引物采用 Vector NT 软件设计,由武汉中和生物科技有限公司合成,其编号和序列见表 1。测序引物为 T3 和 T7 启动子通用引物,表达载体的测序引物为 HCP1。

1.2 枯草芽孢杆菌的培养

枯草芽孢杆菌采用 LB 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养。诱导表达试验中的枯草芽孢杆菌采用添加质量分数 5% 麦芽糖(诱导物)的 LB 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养。葡萄糖抑制试验中的枯草芽孢杆菌采用添加质量分数 5% 葡萄糖的 LB 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养。重组枯草芽孢杆菌采用选择性培养基(含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 培养基)培养。

1.3 表达载体 pGJ222 的构建

枯草芽孢杆菌表达载体 pGJ222 的构建图谱见图 1。以质粒 pGLVM1 为模板,用引物 Pglv-1-up 和 Pglv-2-down(new) PCR 扩增片段长度为 270 bp 的枯草芽孢杆菌麦芽糖启动子*glv*-mut。在*glv*-mut 5'和 3'端分别引入 *Apa* I 和 *Eco*R I 的限制性酶切位点后克隆到 pGEMT Vector,构建 pGLV-mut。用 *Apa* I 和 *Eco*R I 消化 pGLV-mut,回收启

动子片段,将其克隆到枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pGJ244 的相应位点,构建表达载体 pGJ148A。用引物 bga-up 和 bga-down 从质粒 pDL 中扩增 2.0 kb 的嗜热脂肪芽孢杆菌热稳定性 β -半乳糖苷酶基

因(*bgaB*)。回收目的基因片段,经 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切后,克隆于表达载体 pGJ148A 的 *glv-mut* 下游,构建 *bgaB* 基因的枯草芽孢杆菌表达载体 pGJ222。

表 1 本试验所用引物及寡核苷酸序列
Table 1 Primers and oligonucleotides

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	限制性内切酶 Restriction enzyme
Pglv-1-up	TTGGGCCCCGGCATGTATCCGAATC	<i>Apa</i> I
Pglv-2-down(new)	GGGCGAATTCCGACCTCCTTGATAAAATTTTAC	<i>EcoR</i> I
bga-up	GGCGAATTCATGAATGTGTTATCCTC	<i>EcoR</i> I
bga-down	GCGGATCCAGGAGCTCTTAGC	<i>Bam</i> H I, <i>Sac</i> I
GlvA-fro-up	TTGGTACCGTTTCTCTGACACACCGTTTC	<i>Kpn</i> I
GlvA-fro-down	TTGGGGCCCTGAATTTTAAAGTGAATATACGC	<i>Apa</i> I
GlvA-bac-up	GCGGAATTCATGAAGAAAAAATCATTCTC	<i>EcoR</i> I
GlvA-bac-down	TTGAGCTCGGAATAATTGAGCATCC	<i>Sac</i> I
P43-1-up	TTGGGGCCCTCAGCATTATTGAGTGT	<i>Apa</i> I
P43-2-up	TTGGATCCTCAGCATTATTGAGTGG	<i>Bam</i> H I
P43-down	GCGGAATTCATTCTCTCTTACCTATAATG	<i>EcoR</i> I
Spec- I -up	TTGGATCCGAATGGCGATTTTC	<i>Bam</i> H I
Spec- I -down	GGCGTCGACTTGAAAAAAGTGTTC	<i>Sal</i> I
Ehem-up	TTGAATTCATGACCCTTTTAGCACTCG	<i>EcoR</i> I
Ehem-down	TTTCTAGATACTGCTACTCCAGCCCGAG	<i>Xba</i> I
Bhem-up	TTGAATTCATGCATATACTTGTGTGGG	<i>EcoR</i> I
Bhem-down	TTTCTAGAAATCATTACAGCTTTCACTCAC	<i>Xba</i> I
HCP1	CAAGCAGCAGATTACGCG	

注:序列中斜体部分为酶切位点。
Note:The sequences in italics indicate restriction sites introduced for potential cloning purposes.

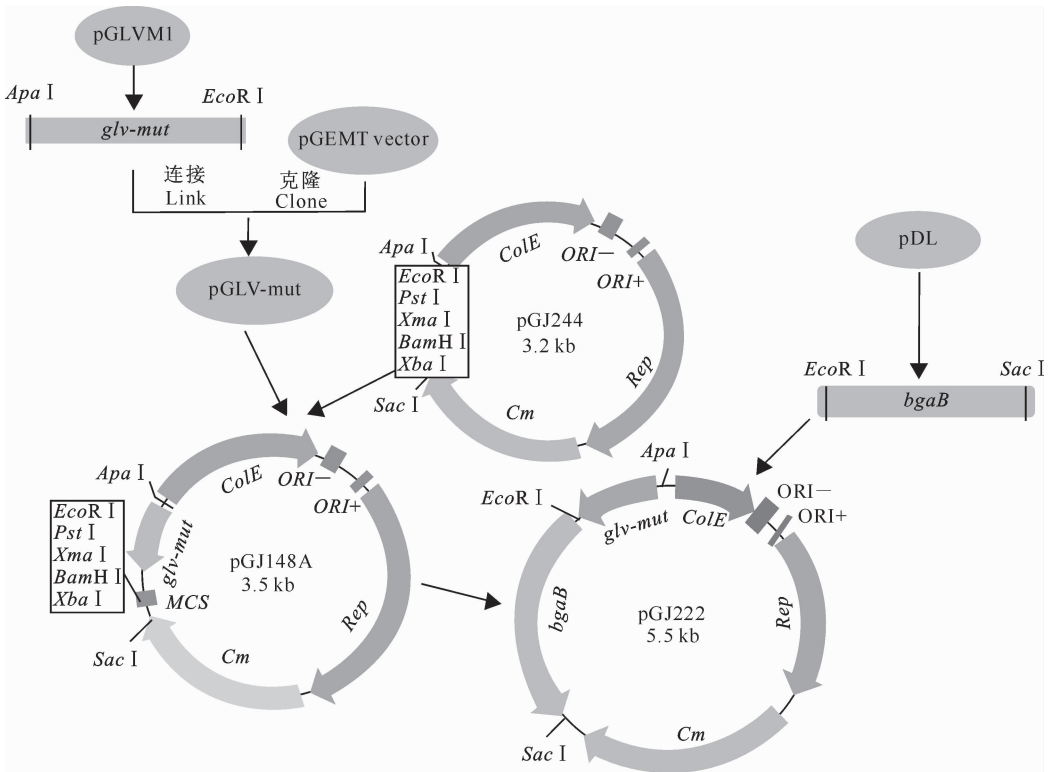


图 1 枯草芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶编码基因表达载体 pGJ222 的构建图谱
Fig. 1 Construction sketch of expression vector pGJ222 of *B. subtilis*

1.4 重组菌 *B. subtilis* 1A747(pGJ222)的构建

采用文献[15]报道的方法将 pGJ222 电转化到 *B. subtilis* 1A747 菌株,获得 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)。采用选择性培养基培养重组菌 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222),于 2, 4, 6, ..., 64 h 测定其 OD_{595} 值,绘制其生长曲线,并用 Olympus CX41 显微镜观察其菌落形态。

1.5 *B. subtilis* 1A747(pGJ222)表达的检测

1.5.1 蛋白的 SDS-PAGE 检测 对重组菌 *B. subtilis* 1A747(pGJ222)进行诱导表达,参照文献[16]方法制备样品,用 BIO-RAD(Mini Protein III)垂直电泳系统进行 SDS-PAGE 检测。

1.5.2 β -半乳糖苷酶活性的测定 β -半乳糖苷酶活性测定参照文献[17-18]的方法进行。 β -半乳糖苷酶酶活定义为:55 °C 下,每 min 催化 ONPG 生成 1 μ mol ONP 的酶量为一个酶活单位(U)。

1.5.3 蛋白的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)和酶谱(Zymograph)分析 参考文献[19]方法进行 Native-PAGE,电泳后将凝胶用 Z Buffer 浸泡 15 min,然后与含 X-Gal(终质量浓度 40 μ g/mL)的 Z Buffer 装入杂交袋,55 °C 水浴 15 min 后利用凝胶成像系统(Bio-Rad, Gel Doc XR)成像。

1.5.4 葡萄糖抑制试验 对重组菌 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)进行葡萄糖抑制试验,以添加质量分数 5%麦芽糖的 LB 培养基培养的重组菌 *B. subtilis* 1A747(pGJ222)为对照。采用葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖含量,具体操作参照葡萄糖测定试剂盒说明书进行,绘制产酶量和葡萄糖含量随时间的变化曲线。

1.6 表达宿主 *B. subtilis* BCYL 的构建及表达效果检测

在 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)的表达调控试验中,麦芽糖对表达有诱导作用,而葡萄糖对表达有抑制作用。发酵液的葡萄糖含量与产酶量之间呈现彼消此长的趋势。为了进一步提高表达效果,将 *B. subtilis* 1A747 基因组的麦芽糖操纵元启动子用枯草芽孢杆菌组成型启动子 P43 替换,构建优化表达宿主,以解除葡萄糖对调控蛋白和麦芽糖转运蛋白的反馈抑制,进一步缓解葡萄糖对表达系统的抑制作用。

1.6.1 整合载体 pCYL25 的构建 枯草芽孢杆菌整合载体 pCYL25 的构建图谱见图 2。提取 *B. subtilis* 1A747 的基因组 DNA,以其为模板,用 2 组引物(GlvA-fro-up 和 GlvA-fro-down 及 GlvA-bac-up 和 GlvA-bac-down),分别扩增枯草芽孢杆菌基因组

中麦芽糖启动子上游 500 bp 的 *GAf* 片段和下游 500 bp 的 *GAb* 片段。回收 *GAf* 和 *GAb* 片段,将其分别克隆到 pGEMT-Vector 中,得到 pGEMT-*GAf* 和 pGEMT-*GAb*。

以 *B. subtilis* 1A747 的基因组 DNA 为模板,用引物 P43-1-up 和 P43-down PCR 扩增 P43 启动子,将其克隆到 pGEMT-Vector 中,得到 pGEMT-P43。用 *Apa* I 和 *Eco* R I 消化 pGEMT-P43,回收启动子 P43 片段,克隆到枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pGJ244 中,得到表达载体 pGJ288R。用 *Eco* R I 和 *Sac* I 消化 pGEMT-*GAb*,回收 *GAb*,克隆到 pGJ288R 中,构建 *GAb* 的表达载体 pCYL17。

以 *B. subtilis* 1A747 的基因组 DNA 为模板,用引物 P43-2-up 和 GlvA-bac-down PCR 扩增 800 bp 的 P43-*GAb* 表达盒,将其克隆到 pGEMT-Vector 中,得到 pCYL19。

以 pDG1728 为模板,用引物 Spec-I-up 和 Spec-I-down PCR 扩增 1.1 kb 的壮观霉素抗性基因 *spec*,将其克隆到 pGEMT-Vector 中,得到 pGEMT-*spec*。用 *Bam* H I 和 *Sal* I 消化 pGEMT-*spec*,回收 *spec* 基因,克隆到 pE3 的相应位点,得到 pGJ265。用 *Kpn* I 和 *Apa* I 消化 pGEMT-*GAf*,回收 *GAf*,将其克隆到 pGJ265 的相应位点,得到 pYG34。用 *Bam* H I 和 *Sac* I 消化 pCYL19,回收 P43-*GAb* 表达盒,将其克隆到 pYG34 中,构建整合载体 pCYL25(图 2)。

1.6.2 优化表达宿主 *B. subtilis* BCYL 的构建

利用 *Sca* I 线性化整合载体 pCYL25,电转化 *B. subtilis* 1A747,挑选有壮观霉素抗性的克隆,得到重组子 *B. subtilis* BCYL,提取其基因组进行 *Apa* I 和 *Sac* I 酶切检测和 Southern-blot 检测, Southern-blot 检测方法参考文献[15]和地高辛标记试剂盒说明书进行。用引物 Spec-I-down 和 P43-down,从整合载体 pCYL25 中扩增包括壮观霉素抗性基因和 P43 启动子的 1 kb 片段作为探针,用地高辛标记。用 *Eco* R I 和 *Sal* I 消化基因组 DNA,进行 Southern-blot 检测。从检测正确的克隆子基因组中扩增 P43 表达盒,送上海华大基因有限公司测序。

1.6.3 优化表达宿主 *B. subtilis* BCYL (pGJ222)表达效果的检测 将表达载体 pGJ222 电转化到重组宿主 *B. subtilis* BCYL 中,得到 *B. subtilis* BCYL (pGJ222),对该表达系统进行诱导表达试验,并进行葡萄糖抑制试验,以 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)

The diagram illustrates the construction of the pCYL25 vector through several steps:

- Initial Components:**
 - 麦芽糖操纵元 (Altolse utilization operon):** Contains *Pglv*, *glvA*, *glvC*, and *glvR* genes.
 - 枯草芽孢杆菌基因组DNA (Chromosomal DNA of *B. subtilis*):** Provides the **P43启动子 (P43 promoter)**.
- Intermediate Vectors:**
 - pGEMT-GAF:** Constructed by inserting the *Gaf* gene into the *pGEMT* vector.
 - pGEMT-GAD:** Constructed by inserting the *Gad* gene into the *pGEMT* vector.
 - pGJ265:** Constructed by combining *pDG1728* (containing *spec*) and *pE3*.
 - pGJ288R:** A circular vector containing *P43*, *MCS*, *ORI-*, *ORI+*, *Rep*, and *Cm* resistance.
 - pCYL17:** Constructed by inserting *Gad* into *pGJ288R*.
 - pCYL19:** Constructed by inserting *P43* into *pCYL17*.
- Final Vector:**
 - pCYL25:** The final construct, created by combining *pCYL19* and *pGJ265*. It contains the *Gaf*, *spec*, *P43*, and *Gad* genes, along with *ori*, *rep*, and *amp* resistance markers.

Fig. 2 Construction sketch of integration vector pGJ222 of *B. subtilis*

pGJ-EhemA 和 pGJ-BhemA 转化 *B. subtilis* BCYL

进行诱导表达,以 *B. subtilis* BCYL (pGJ148A) 为对照,对其表达产物进行 SDS-PAGE 检测,并对 BhemA 诱导表达发酵液用紫外分光光度计(HITA-CHI U-3010, Solution 2)在波长 200~700 nm 处进行扫描,以确定目标产物的表达。

2.1 载体 pGJ222 的表达分析

2.1.1 发酵曲线的测定 试验结果(图3)发现,*B. subtilis* 1A747(pGJ222)在扩大培养后4 h进入对数生长期,12 h后进入生长平台期。8,24和32 h的镜检结果(图3)显示,8 h时菌群处于分裂期,24 h时菌体开始变粗短,32 h时菌落出现了较多的芽孢。因此,确定测定酶活性的取样时间为6,12,24和36 h。

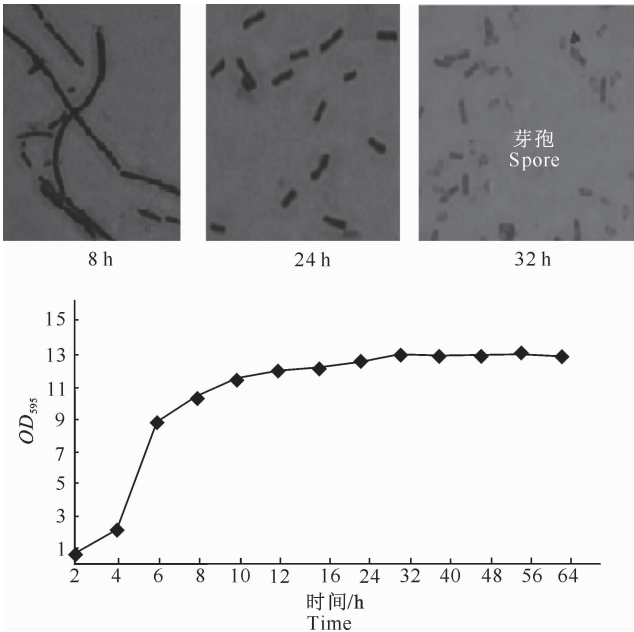


图 3 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)的菌落形态(×400)和生长曲线

Fig. 3 Morphological observation(×400) and growth curve of *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)

2.1.2 β -半乳糖苷酶活性的测定 β -半乳糖苷酶活性测定结果显示,添加质量分数 5%麦芽糖的培养基在整个发酵过程中的酶活性远高于未添加麦芽糖的培养基,在 24 h 时酶活性达到最高(16 U/mL),是未添加组的 12 倍。添加质量分数 5%葡萄糖组的酶活性低于未添加组和添加质量分数 5%麦芽糖组,这一结果验证了葡萄糖对启动子的抑制作用。

2.1.3 SDS-PAGE、Native-PAGE 检测和 Zymo-

graph 分析 SDS-PAGE 检测结果显示,在 70 ku 附近有一明显的条带,与 bgaB 蛋白的分子质量大小一致(图 4A),经凝胶扫描分析显示,bgaB 的表达量达到菌体总可溶性蛋白的 18%。Native-PAGE 显示,*B. subtilis* 1A747 (pGJ222)诱导 24 h 的蛋白提取物有明显的条带(图 4B)。Zymograph 分析显示,表达的 bgaB 蛋白具有生物活性(图 4C),表明启动子 *glv-mut* 成功地实现了 *bgaB* 的表达。

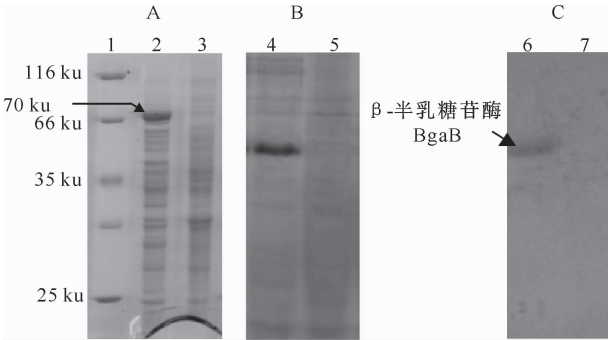


图 4 β -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE(A)、Native-PAGE(B)和酶谱(C)分析结果

- 1. 蛋白质分子质量标准;2. *B. subtilis* 1A747 (pGJ222) 诱导 24 h 的蛋白提取物;
- 3. *B. subtilis* 1A747 (pGJ148A) 诱导 24 h 的蛋白提取物;4,6. *B. subtilis* 1A747 (pGJ222) 诱导 24 h 的蛋白提取物;
- 5,7. *B. subtilis* 1A747 (pGJ148A) 诱导 24 h 的蛋白提取物

Fig. 4 SDS-PAGE (A),Native-PAGE (B) and Zymogram (C) analysis of β -galactosidase

- 1. Molecular weight Marker;2. Protein extract of *B. subtilis*1A747 (pGJ222) after induction of 24 h;3. Protein extract of *B. subtilis*1A747 (pGJ148A) after induction of 24 h;4,6. Protein extract of *B. subtilis*1A747 (pGJ222) after induction of 24 h;
- 5,7. Protein extract of *B. subtilis*1A747 (pGJ148A) after induction of 24 h

2.1.4 葡萄糖抑制试验 β -半乳糖苷酶活性和葡萄糖含量随时间的变化曲线如图 5 所示。由图 5 可

知,添加质量分数 5%的葡萄糖试验组在 12 和 24 h 的酶活性明显低于添加质量分数 5%麦芽糖的对照

组,分别是对照组的 13%和 61%,说明添加葡萄糖对启动子有抑制作用,本试验中麦芽糖启动子的葡萄糖抑制位点虽有突变,但抑制作用依然存在;随着

发酵液中葡萄糖含量的降低,葡萄糖添加组酶活性显著增加。

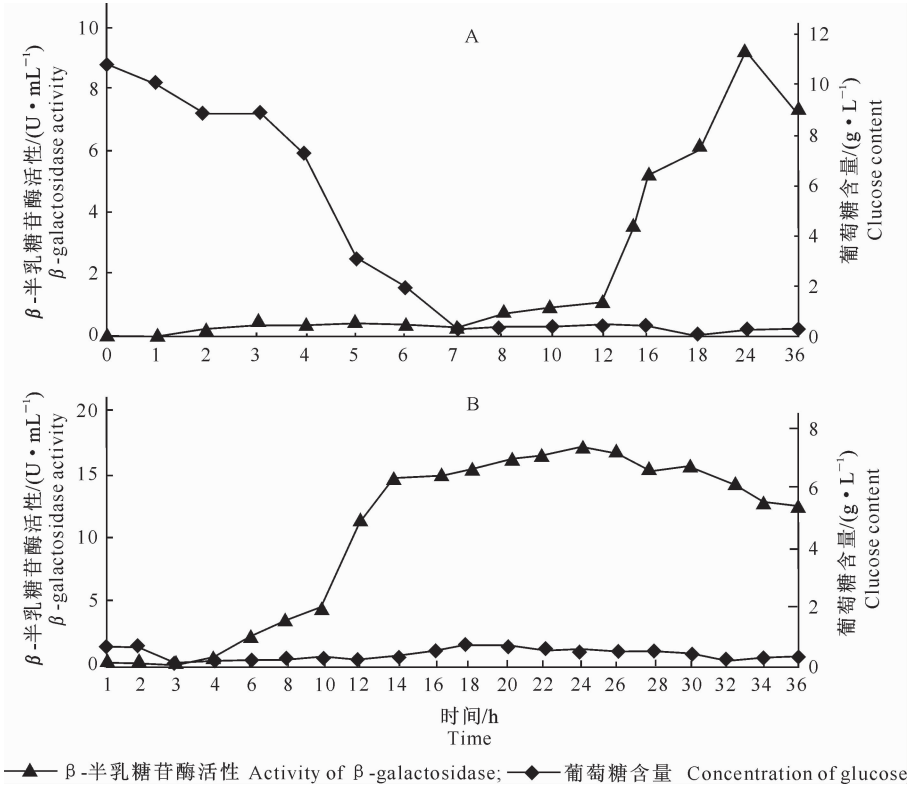


图 5 在添加葡萄糖(A)与麦芽糖(B)培养基中 *B. subtilis*1A747 (pGJ222) β -半乳糖苷酶活性与葡萄糖含量的关系

Fig. 5 Relationship between β -galactosidase and glucose content in the medium supplemented with 5% glucose (A) and,5% glucose and 5% maltose

2.2 优化表达系统的构建及诱导表达

2.2.1 优化表达宿主的检测 *B. subtilis* BCYL 基因组 DNA 酶切和 Southern-blot 检测结果(图 6)显

示,P43 启动子整合到预期的位点。从 *B. subtilis* BCYL 基因组 DNA 中 PCR 扩增 P43 表达盒,测序结果显示,其读码框正确,表明获得了重组的表达宿主。

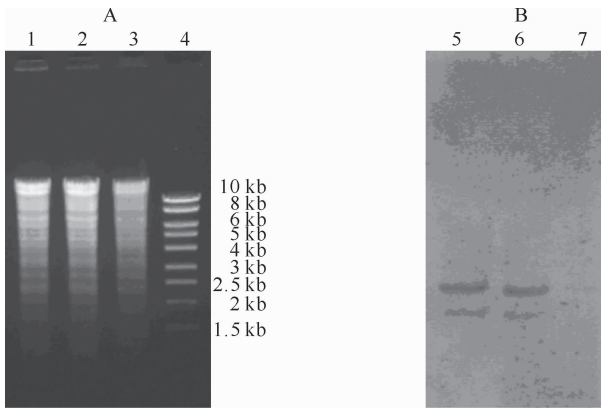


图 6 *B. subtilis* BCYL 基因组 DNA 的酶切图谱(A)和 Southern-blot(B)检测结果

1,2. *Apa* I 和 *Sac* I 双酶切 *B. subtilis* BCYL 基因组 DNA;3. *Apa* I 和 *Sac* I 双酶切 *B. subtilis* 1A747 基因组 DNA;

4. DNA 分子量标准;5,6. *B. subtilis* BCYL 基因组 DNA Southern-blot 检测;7. *B. subtilis* 1A747 基因组 DNA Southern-blot 检测

Fig. 6 Digestion (A) and Southern-blot (B) analysis of *B. subtilis* BCYL

1,2. *B. subtilis* BCYL chromosomal DNA digested by *Apa* I and *Sac* I ;3. *B. subtilis* 1A747 chromosomal DNA digested by *Apa* I and *Sac* I ;

4. DNA Marker;5,6. Southern-blot analysis of *B. subtilis* BCYL;7. Southern-blot analysis of *B. subtilis* 1A747, which as a negative control

2.2.2 优化表达系统的检测 SDS-PAGE 检测结果(图 7A) 显示,在优化的表达系统中,*bgaB* 实现了表达。质量分数 5%麦芽糖的诱导结果(图 7B)表明,*B. subtilis* BCYL (pGJ222)的 β -半乳糖苷酶活性高于 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222),其在 24 h 时的产酶量最高,达到 21 U/mL,较 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222)提高了 30%。葡萄糖抑制试验结果表明,

与 *B. subtilis* 1A747 (pGJ222) 相比,葡萄糖对 *B. subtilis* BCYL (pGJ222) β -半乳糖苷酶活性的抑制作用大幅度下降,12,24 和 36 h *B. subtilis* BCYL (pGJ222)的 β -半乳糖苷酶活性分别为 8,13 和 17 U/mL,而 *B. subtilis* 1A747(pGJ222)的 β -半乳糖苷酶活性分别为 1.6,8.6 和 7.8 U/mL。

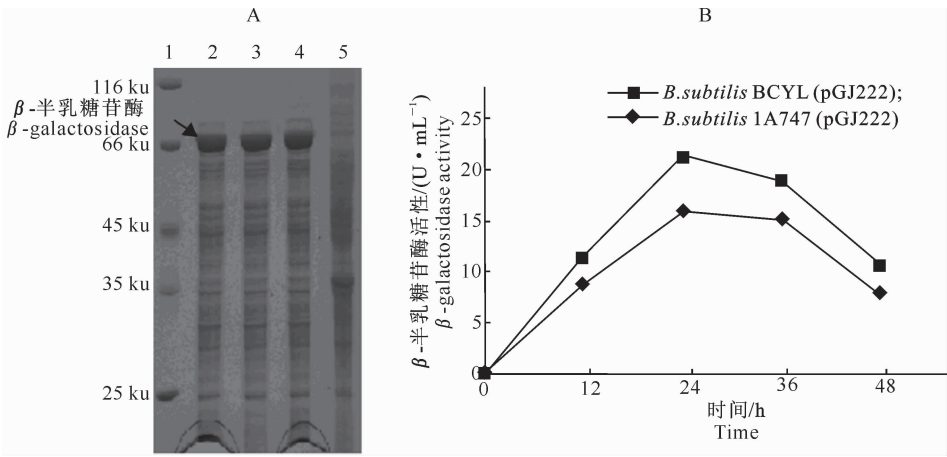


图 7 *B. subtilis* BCYL (pGJ222) β -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE(A)及其活性分析(B)

1. 蛋白质分子质量标准;2~4. *B. subtilis* BCYL (pGJ222) 诱导 24 h 的蛋白粗提物;
5. *B. subtilis* 1A747(pGJ222)诱导 24 h 的蛋白粗提物

Fig. 7 SDS-PAGE and production analysis of β -galactosidase from *B. subtilis* BCYL (pGJ222)

1. Molecular weight Marker;2~4. Crude protein extract of *B. subtilis* BCYL (pGJ222) after induction of 24 h;
5. Crude protein extract of *B. subtilis* 1A747(pGJ222)after induction of 24 h

2.3 *EhemA* 和 *BhemA* 基因在枯草芽孢杆菌中的表达

将 pGJ-EhemA 和 pGJ-BhemA 转化枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* BCYL 进行表达,结果显示,用质量分数 5%的麦芽糖诱导 24 h,2 种蛋白均获得可溶性

表达(图 8A),发酵液呈红褐色,为 B_{12} 合成途径中间产物-卟林类物质所致^[20]。*BhemA* 诱导表达发酵液紫外分光光度计(波长 200~700 nm)扫描结果显示,表达产物在 420 nm 处有明显吸收峰(图 8B)。

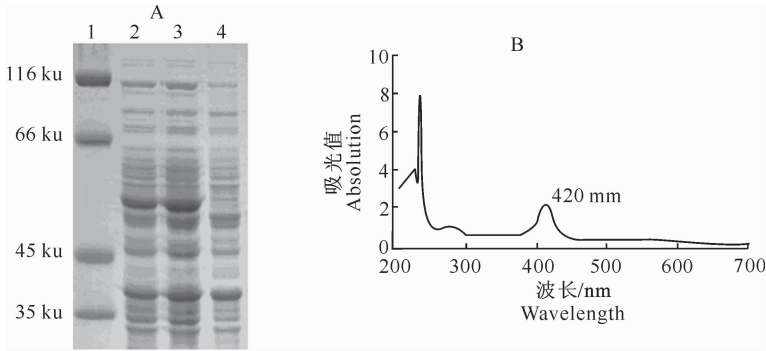


图 8 *EhemA* 和 *BhemA* 粗蛋白的 SDS-PAGE(A)及 *BhemA* 诱导表达发酵液的扫描(B)分析

1. 蛋白质分子质量标准;2. *EhemA* 诱导 24 h 的菌体粗蛋白提取物;3. *BhemA* 诱导 24 h 的菌体粗蛋白提取物;
4. *B. subtilis* BCYL(pGJ148A)诱导 24 h 的粗蛋白提取物(对照)

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of *EhemA* and *BhemA*(A) and scanning of *BhemA* incubation broth after induction of 24 h (B)

1. Molecular weight marker;2. Crude protein extract of *EhemA* after inducible expression of 24 h;
3. Crude protein extract of *BhemA* after inducible expression of 24 h;4. Crude protein extract of *B. subtilis* BCYL(pGJ148A) control

3 讨 论

在枯草芽孢杆菌基因工程研究中,最常用的诱导性启动子是 *spac* 和 *xyl*。*spac* 是枯草芽孢杆菌噬菌体 SPO1 与大肠杆菌乳糖操纵子融合的启动子,在 IPTG 诱导下可以高效表达;*xyl* 启动子由巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 木糖基因的表达元件构建而成。*xyl* 由自己编码的 *xylR* 阻遏蛋白严格控制表达,与启动子 *spac* 相比,其调控更严谨,诱导效率更高。这 2 个启动子在枯草芽孢杆菌中应用很广,但是它们也有自己的缺点,其诱导物 IPTG、木糖的价格较高,而且 IPTG 有毒性,因此它们在实际应用中有很大的局限性。在本试验中,笔者利用麦芽糖启动子构建表达系统克服了这 2 个启动子的局限性。

为了提高启动子的强度,同时减小葡萄糖的抑制作用,本研究对 pGJ222 中麦芽糖启动子的葡萄糖抑制位点进行突变,结果提高了启动子的表达强度,但是葡萄糖的抑制现象依然存在。这是由枯草芽孢杆菌麦芽糖操纵元的调控特点决定的。因为虽然突变了表达载体上麦芽糖启动子本身的 *cre* 位点,解除了葡萄糖对载体启动子的反馈抑制,但是在菌体的调控系统中,麦芽糖操纵元启动子对作为正调控组分的 6-磷酸麦芽糖和调节蛋白仍然有调控作用,葡萄糖仍然可以通过对麦芽糖操纵元启动子的抑制,从而实现对转运蛋白和正调控蛋白表达的抑制。此外,在麦芽糖通过 PTS 系统磷酸化的过程中,葡萄糖也可以通过反馈抑制实现对麦芽糖操纵元的调控。

本试验通过替换麦芽糖操纵元启动子,进一步解除葡萄糖的抑制,提高表达活性。结果表明,改造过的表达系统表达强度有较大幅度的提高,而且对葡萄糖抑制的敏感性降低。用该表达系统对嗜热脂肪芽孢杆菌 β -半乳糖苷酶进行诱导表达,结果表明,24 h 产酶量达到 21 U/mL。而笔者在另一试验中,用大肠杆菌商用高效表达系统 pET28a 对 *bgaB* 进行表达,发现 IPTG 诱导后 10 h 酶活最高,为 24 U/mL,与陈卫等^[18]的报道一致。表明与大肠杆菌商用表达系统相比,本试验构建的枯草芽孢杆菌表达系统也具有较高的表达水平,且诱导物(本身是发酵碳源)价格低廉,在实际应用中具有优势。

本研究构建的表达系统可作为目标基因在枯草芽孢杆菌胞内高效表达的工具,实现对基因的高水平表达,目前笔者已经利用该系统对枯草芽孢杆菌

生物素合成途径和维生素 B₁₂ 前期途径的多个蛋白酶编码基因进行了高效表达。

[参考文献]

- [1] Bron S, Bolhuis A, Tjalsma H, et al. Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in *Bacilli* [J]. *Biotechnol*, 1998, 64: 3-13.
- [2] Hueck C J, Hillen W. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: A global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 15(3): 395-401.
- [3] Janniere L, Bruand C, Ehrlich S D. Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors [J]. *Gene*, 1990, 87(1): 53-61.
- [4] Kaltwasser M, Wiegert T, Schumann W. Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2624-2628.
- [5] Feucht A, Lewis J. Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent protein fusion in *Bacillus subtilis* [J]. *Gene*, 2001, 264(2): 289-297.
- [6] Bolhuis A, Sorokin A, Azevedo V, et al. *Bacillus subtilis* can modulate its capacity and specificity for protein secretion through temporally controlled expression of *sipS* gene for signal peptidase I [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 22(4): 605-618.
- [7] Yamamoto H, Serizawa M, Thompson J, et al. Regulation of *glv* operon in *Bacillus subtilis*: YfiA (GLvR) is a positive regulator of the operon that is repressed through CcpA and cre [J]. *Bacteriol*, 2001, 183(7): 5110-5121.
- [8] Thompson J, Pikis A, Ruvinov S B, et al. The gene *glvA* of *Bacillus subtilis* 168 encodes a metal-requiring, NADH- dependent 6-phospho-glucosidase [J]. *Bol Chem*, 1998, 273 (42): 27347-27356.
- [9] Schöner T, Buder T, Dahl M. Properties of maltose-inducible α -glucosidase MalL (sucrase-isomaltase-maltase) in *Bacillus subtilis*: Evidence for its contribution to maltodextrin utilization [J]. *Res Microbiol*, 1999, 150(3): 167-177.
- [10] Hueck C, Hillen W, Saier M. Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria [J]. *Res Microbiol*, 1994, 145(7): 503-518.
- [11] Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, et al. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(5): 1206-1210.
- [12] Postma P W, Lengeler J W, Jacobson G R. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria [J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57(3): 543-594.
- [13] Stülke J, Hillen W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus species* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 849-880.
- [14] Yoshida K, Kobayashi K, Miwa Y, et al. Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis* [J]. *Nucl Acid Res*, 2001, 29(3): 683-692.

(下转第 88 页)