

枯草芽孢杆菌 *bioW* 基因在大肠杆菌中的表达 及其对宿主生长的抑制作用

杨明明^{1,2}, 杨朝霞², 张西锋², 王 晶², 刘锦妮², 岑沛霖¹

(1 浙江大学 材料与化学工程学院, 浙江 杭州 310027; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**克隆枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)生物素基因(*bioW*),在 *bioW* 基因缺陷型大肠杆菌中进行表达,探讨其对 *bioW* 基因缺陷型大肠杆菌的遗传互补作用和对宿主的生长抑制作用,为生物素基因工程菌的构建奠定基础。**【方法】**用大肠杆菌表达载体 pEXT20 和枯草芽孢杆菌 *bioW* 基因构建表达载体 pEXT20-*bioW*,并将其转化到大肠杆菌 DH5 α 和生物素基因缺陷型大肠杆菌株 R876 中,构建重组菌 DH5 α (pEXT20-*bioW*)和 R876(pEXT20-*bioW*)。分别将 R876、DH5 α (pEXT20-*bioW*)、R876(pEXT20-*bioW*)在不同培养基和不同 IPTG 浓度下进行培养,检测 *bioW* 基因对 *bioW* 基因缺陷型大肠杆菌株的遗传互补和生长抑制作用。**【结果】**在生物素限制性培养基中,只有同时加入庚二酸和 IPTG 时,R876(pEXT20-*bioW*)才能生长。在不含 IPTG 的 LB 培养基中,R876(pEXT20-*bioW*)生长正常;在添加不同浓度 IPTG 的 LB 培养基中,DH5 α (pEXT20-*bioW*)和 R876(pEXT20-*bioW*)生长均受到不同程度的抑制。**【结论】***bioW* 基因对 *bioW* 基因缺陷型大肠杆菌有遗传互补作用。在大肠杆菌中,*bioW* 基因的表达对宿主有生长抑制作用。

[关键词] 枯草芽孢杆菌;大肠杆菌;*bioW* 基因;生长抑制;遗传互补

[中图分类号] Q563⁺.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2009)01-0056-05

Expression of the *B. subtilis bioW* gene in *E. coli* and its growth inhibition of host

YANG Ming-ming^{1,2}, YANG Zhao-xia², ZHANG Xi-feng²,
WANG Jing², LIU Jin-ni², CEN Pei-lin¹

(1 College of Materials Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;
2 College of Animal Science and Technology, Northern West A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**In order to construct biotin genetic engineering bacteria, the *Bacillus subtilis* *bioW* gene involved in biotin biosynthesis pathway was investigated in this study. **【Method】**The *B. subtilis bioW* gene was PCR amplified from *B. subtilis* chromosomal DNA and, the expression vector pEXT20-*bioW* was constructed by cloning the *bioW* into the *E. coli* expression pEXT20. Then, the pEXT20-*bioW* was transformed into the *E. coli* R876 and *E. coli* DH5 α to examine genetic complementation respectively. **【Result】**When both pimelic acid and IPTG were supplemented in the biotin-free medium, R876(pEXT20-*bioW*) could grow, conforming that the *bioW* complemented the defect of *bioC*. In the LB medium (without IPTG), *E. coli* R876(pEXT20-*bioW*) grew normally, however, when high concentration IPTG was added, the growth of both DH5 α (pEXT20-*bioW*) and R876(pEXT20-*bioW*) was inhibited. **【Conclusion】**The *bioW* had genetic complementation to the bacteria lacking of biotin gene and the growth of *E. coli* harbouring

* [收稿日期] 2008-02-25
[基金项目] 国家重点新产品计划项目(2003ED760039)
[作者简介] 杨明明(1971—),男,陕西汉中,在读博士,主要从事应用微生物与生物技术研究。E-mail: yangjinxin@vip.163.com
[通信作者] 岑沛霖(1945—),男,浙江建德人,教授,博士生导师,主要从事生物化工和酶工程研究。E-mail: biodna@126.com

pEXT20-*bioW* was inhibited.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *bioW* gene; growth inhibition; complementation

枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 是非致病性的革兰氏阳性菌, 具有外分泌能力强、细胞壁不含内毒素和发酵性良好等特点, 被广泛地应用于酶制剂的工业生产和外源基因的表达研究中^[1-2]。随着枯草芽孢杆菌基因组测序工作的完成, 其遗传背景更加清晰, 分子遗传操作更加完善, 在发酵工业上的应用范围也得到进一步扩大^[3]。通过基因克隆、基因表达和基因敲除等遗传操作方法, 改变枯草芽孢杆菌体内代谢途径, 增强参与合成途径酶的表达或敲除参与分解代谢酶的基因, 从而积累次级代谢产物, 生产维生素、氨基酸和有机小分子等已成为发酵工业研究的热点之一。

枯草芽孢杆菌生物素 (维生素 B₇) 是生物素合成途径的产物。与其他的革兰氏阳性菌相似, 枯草芽孢杆菌生物素合成的途径是以脂肪酸为前底物, 在一系列蛋白酶催化下生成庚二酸, 庚二酸在生物素基因 (*bioW* 基因) 编码的庚二酰 CoA 合成酶催化下生成庚二酰 CoA, 庚二酰 CoA 在 *bioAFDB* 基因编码的 5 个蛋白酶的催化下生成生物素^[4-7]。与枯草芽孢杆菌的生物素合成途径不同, 革兰氏阴性大肠杆菌的庚二酰 CoA 是在分别位于不同基因簇的 *bioC* 和 *bioH* 基因编码的 2 个蛋白酶的参与下, 由长链脂肪酸生成的, 目前对其具体的合成途径尚不清楚^[8-9]。在大肠杆菌生物素合成途径中, 缺乏庚二酸生成庚二酰 CoA 这一代谢途径^[10-13]。利用基因工程技术, 在大肠杆菌中构建庚二酸生成庚二酰 CoA 的代谢途径, 对于 *bioW* 基因功能的确证和生物素高产基因工程菌的构建具有重要意义, 但目前此方面的研究鲜见报道。本研究对参与枯草芽孢杆菌生物素合成的庚二酰 CoA 合成酶基因 *bioW* 进行了克隆, 构建了 *bioW* 的表达载体, 并在生物素缺陷型大肠杆菌株中进行诱导表达, 通过检测 *bioW* 基因对大肠杆菌生物素合成前期途径的影响, 研究植草芽孢杆菌 *bioW* 基因对大肠杆菌生物素缺陷株生物素合成途径的影响, 以期对生物素基因工程菌的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 由武汉阳光广济医药开发有限公司提供; 质粒 pEXT20 由 Thomas Linn 博士惠赠; 枯草芽孢杆菌 AS1094 由

中国菌种保藏中心 (CCSC) 提供; *bioW* 基因缺陷型大肠杆菌 R876 由英国大肠杆菌基因组保藏中心 (CGSC) 提供。

1.1.2 生化试剂 限制性内切酶、修饰酶、T₄ DNA 连接酶、基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promage 公司; La Taq DNA 聚合酶和 DNA 标样 DL2000 均购自 TaKaRa 公司; 酵母粉、蛋白胨、牛肉膏购自武汉大风公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒及 PCR 纯化回收试剂盒均购于 Omega 公司; IPTG 购自华美公司; DNA 标样 #0393 购于 Fermentas 公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 NCBI 公布的枯草芽孢杆菌 *bioW* 基因序列 (登录号为: NC00094) 设计 1 对引物: 上游引物 5'-GGCGAATTCATG-CAAGAAGAACTTTT-3'; 下游引物 5'-GCGG-TACCATCAAATCATGAGTCATG-3'。上下游引物中下划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点。引物由 Stragaty 公司合成。

1.2 AS1094 基因组 DNA 的提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取枯草芽孢杆菌 AS1094 基因组 DNA, 具体操作方法参考试剂盒说明书进行。

1.3 *bioW* 基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系为: 10 $\times$ LaTaq DNA 聚合酶 buffer (2 U/ μ L) 2.5 μ L, 上、下游引物 (10 pmol/L) 各 2.0 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 2.0 μ L, 枯草芽孢杆菌 AS1094 基因组 DNA (100 ng/ μ L) 2.0 μ L, MgCl₂ (25 nmol/L) 2.0 μ L, La Taq DNA 聚合酶 (或普通 Taq 酶) 0.5 μ L, ddH₂O 12 μ L, 总体积 25 μ L。

PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 熄火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 pEXT20-*bioW* 表达载体的构建

回收扩增的 *bioW* 基因片段, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切, 回收目的片段, 与经同样双酶切处理的大肠杆菌表达载体 pEXT20 连接, 构建表达载体 pEXT20-*bioW* (图 1)。对构建的 pEXT20-*bioW* 表达载体进行 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, 并将鉴定正确的重组载体送北京奥科生物科技公司测序。测序引物: 5'-TGGCAAATAT-

TCTGAAATGAGCTG-3'。

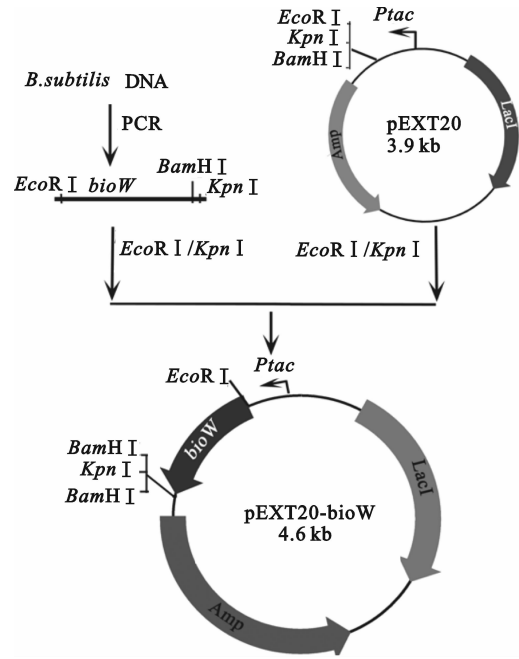


图 1 表达载体 pEXT20-bioW 的构建示意图
Fig. 1 Construction of the expression vector pEXT20-bioW

1.5 bioW 基因的表达

1.5.1 生物素限制性固体培养基 将表达载体 pEXT20-bioW 转化到生物素基因缺陷型大肠杆菌 R876 感受态细胞中,构建重组子 R876 (pEXT20-bioW)。将 R876 和 R876(pEXT20-bioW)分别接种到添加庚二酸(1 g/L)、IPTG(50 μmol/L)和同时添加 IPTG(50 μmol/L)和庚二酸(1 g/L)的生物素限制性固体培养基中,于 37℃ 培养 18 h。

1.5.2 LB 培养基 将表达载体 pEXT20-bioW 转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中,构建重组菌 DH5α (pEXT20-bioW)。将 DH5α (pEXT20-bioW)和 R876(pEXT20-bioW)单菌落分别接种到固体 LB 培养基和含 IPTG(50 μmol/L)的固体 LB 培养基,培养过夜。

1.5.3 bioW 基因对大肠杆菌的生长抑制 将过夜培养的 DH5α(pEXT20-bioW)按 1:100(体积比)的比例分别接种到含不同浓度 IPTG(终浓度分别为 50,100,200,400,600,800 和 1 000 μmol/L)和不含 IPTG 的 LB 液体培养基中,37℃ 培养 6 h,在波长 595 nm 处测定菌液的吸光值(OD₅₉₅)。

2 结果与分析

2.1 bioW 基因的扩增

根据 NCBI 公布的 bioW 基因序列,设计特异性

引物,从枯草芽孢杆菌 AS1094 基因组 DNA 中 PCR 扩增得到 1 条特异性条带(图 2),该条带长度约为 700 bp,与预期结果一致。

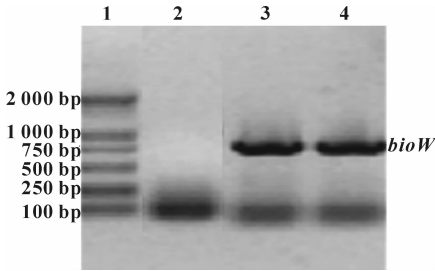


图 2 枯草芽孢杆菌 AS1094 bioW 基因的 PCR 扩增
1. DNA 标样 DL2000;2. 无模板 DNA 的阴性对照;
3,4. PCR 扩增产物

Fig. 2 bioW gene PCR amplified from B. subtilis AS1094
1. DNA marker DL2000;2. Negative control;3,4. PCR amplification production from chromosomal DNA

2.2 表达载体 pEXT20-bioW 的鉴定

酶切鉴定结果显示,pEXT20-bioW 被 EcoR I 和 Kpn I 双酶切为 2 条带,其长度分别约为 700 bp 和 3 900 bp(图 3),与预期目标条带长度一致,表明 bioW 基因片段已被成功克隆入表达载体 pEXT20 中。测序结果显示,在 pEXT20-bioW 中 bioW 基因位于 IPTG 诱导的 Ptac 启动子的下游(图 4),bioW 基因的起始密码子(ATG)与载体的 SD 序列(AG-GA)间隔 10 个碱基,其中包括一个 EcoR I 识别位点,读码框正确。

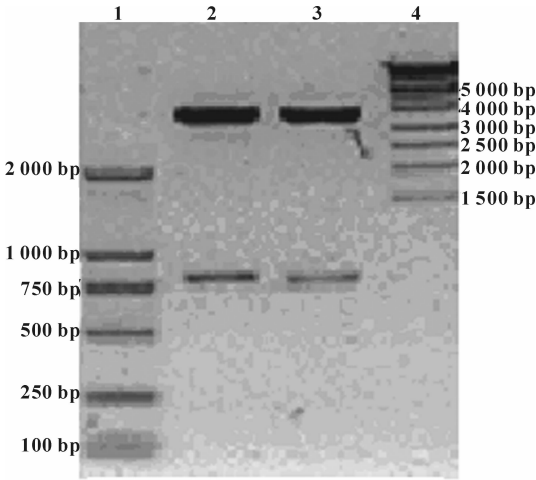


图 3 pEXT20-bioW 载体的酶切鉴定
1. DNA 标样 DL2000;2,3. 经 EcoR I 和 Kpn I 双酶切的 pEXT20-bioW; 4. DNA 标样 #0393

Fig. 3 Digestion of pEXT20-bioW by EcoR I and Kpn I
1. DNA marker DL2000;2,3. Digestion of pEXT20-bioW by EcoR I and Kpn I; 4. DNA marker #0393

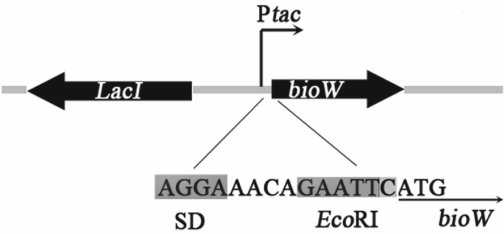


图 4 pEXT20-*bioW* 表达盒示意图

Fig. 4 The expression cassette of pEXT20-*bioW*

2.3 *bioW* 基因的表达

2.3.1 *bioW* 基因对生物素缺陷型大肠杆菌的遗传互补作用 结果显示,在生物素限制性固体培养基、添加 IPTG(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$)的生物素限制性固体培养基和添加 1 g/L 庚二酸的生物素限制性固体培养基中,R876 和 R876(pEXT20-*bioW*)均未生长;在同时添加了 IPTG(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$)和 1 g/L 庚二酸的生物素限制性固体培养基中,接种 R876(pEXT20-*bioW*)的培养平板出现均匀的菌落,接种 R876 的培养平板无菌落(图 5)。表明,在庚二酰 CoA 途径缺陷型大肠杆菌 R876 中,*bioW* 基因在 IPTG 的诱导下表达的庚二酰 CoA 合成酶催化庚二酸生成庚二酰 CoA,说明 *bioW* 基因对大肠杆菌的庚二酰 CoA 合成途径缺陷有遗传互补作用。

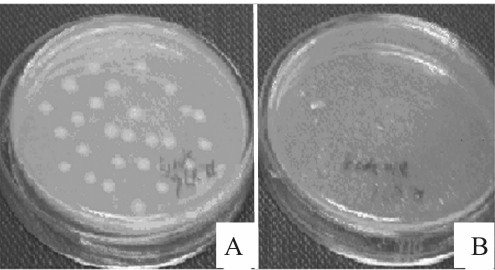


图 5 R876 和 R876(pEXT20-*bioW*)在同时添加 IPTG 和庚二酸的生物素限制性培养基上的培养结果
A. R876(pEXT20-*bioW*);B. R876

Fig. 5 Culture of R876 and R876(pEXT20-*bioW*)in biotin-free medium supplemented with pimelic acid (1 g/L) and IPTG (50 $\mu\text{mol/L}$)
A. Culture of R876 (pEXT20-*bioW*);B. R876

含 pEXT20-*bioW* 的 DH5 α (pEXT20-*bioW*)和 R876(pEXT20-*bioW*)在固体 LB 培养基中均生长正常;在添加 IPTG(终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$)的 LB 培养基中,R876(pEXT20-*bioW*)生长缓慢,并且经过夜培养,质粒严重丢失。从不含 IPTG 的 LB 培养基中提取的 pEXT20-*bioW*,经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定证实,质粒未发生缺失。

2.3.2 *bioW* 基因对大肠杆菌宿主的生长抑制作用

DH5 α (pEXT20-*bioW*)在添加不同浓度的 IPTG 培养基中,生长受到不同程度的抑制,在 LB 液体培养基中,DH5 α (pEXT20-*bioW*)经过 6 h 培养 OD₅₉₅ 达到 1.46;在添加 50 $\mu\text{mol/L}$ IPTG 的 LB 液体培养基中,经过 6 h 培养 OD₅₉₅ 下降到 1.23;在添加 400,600,800 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ IPTG 的 LB 液体培养基中,OD₅₉₅ 约为 0.7。R876(pEXT20-*bioW*)在含不同浓度 IPTG 的 LB 液体培养基中的生长趋势与 DH5 α (pEXT20-*bioW*)相同。表明,IPTG 的诱导表达严重抑制了菌体的生长。提取 400 $\mu\text{mol/L}$ IPTG 诱导的 DH5 α (pEXT20-*bioW*)的质粒进行凝胶电泳,结果显示质粒丢失较严重(图 6)。

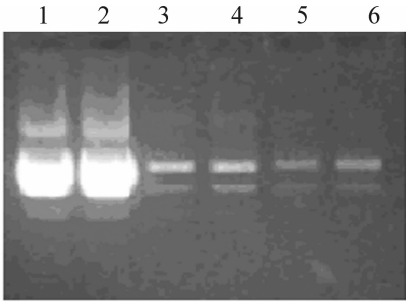


图 6 pEXT20-*bioW* 质粒的电泳图

1~2. LB 培养基中 DH5 α (pEXT20-*bioW*)的质粒;3~6. 添加 400 $\mu\text{mol/L}$ IPTG 的 LB 培养基中 DH5 α (pEXT20-*bioW*)的质粒

Fig. 6 Plasmid DNA of pEXT20-*bioW*

1-2. Plasmid from DH5 α (pEXT20-*bioW*) cultured in LB;
3-6. Plasmid from DH5 α (pEXT20-*bioW*) cultured in LB medium supplemented with 400 $\mu\text{mol/L}$ IPTG

3 讨论

在分子生物学和基因工程研究中,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分别是革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的模式菌种,其基因组测序已经完成,遗传背景比较清楚^[14-15]。参与大肠杆菌和枯草芽孢杆菌体内生物素合成的蛋白酶基因均定位于基因组内,在大肠杆菌内有多种酶参与催化生成庚二酰 CoA,而在枯草芽孢杆菌内庚二酰 CoA 是由 *bioW* 基因编码的蛋白酶催化庚二酸生成,进入庚二酰 CoA 后的生物素合成途径已经清楚^[16]。枯草芽孢杆菌生物素基因的分布和调控相对简单,因此本试验选用枯草芽孢杆菌生物素基因进行生物素基因工程菌的构建,在大肠杆菌中进行表达时,出现了枯草芽孢杆菌生物素基因对宿主生长产生抑制的现象。

由本实验结果可知:①*bioW* 基因对缺乏参与庚

二酰 CoA 合成酶基因的大肠杆菌没有遗传互补作用,但在培养基中补充庚二酸后,大肠杆菌缺陷株可以正常生长,说明 *bioW* 基因编码的庚二酰 CoA 合成酶在大肠杆菌中有催化活性,其可催化外源的庚二酸生成庚二酰 CoA,为生物素的合成提供底物;②大肠杆菌缺乏由庚二酸生成庚二酰 CoA 的途径,在大肠杆菌的脂肪酸代谢池中,似乎缺乏庚二酰 CoA 合成酶的底物——庚二酸;③增加 *bioW* 基因表达载体的诱导水平,宿主菌的生长受到严重的抑制,表明 *bioW* 基因对大肠杆菌的生长有抑制作用;④在未添加庚二酸的 LB 培养基中,DH5 α (pEXT20-*bioW*)和 R876(pEXT20-*bioW*)也发生严重的生长抑制,其抑制作用应该不是来自生物素合成途径自身。

生物体的抑制一般有以下几种情况:外源基因的高表达引起代谢途径中间产物的大量积累,从而抑制了宿主菌的生长;外源基因的表达改变了宿主菌体内的代谢池,导致其生长抑制;外源基因的表达产物与宿之菌体内某些重要代谢的蛋白酶具有竞争抑制作用。笔者推测,*bioW* 基因对大肠杆菌的生长抑制可能是通过后 2 种机制起作用。本实验结果提示,大肠杆菌脂肪酸代谢池中可能缺乏可以被庚二酰 CoA 合成酶利用的底物——庚二酸,在培养基中添加庚二酸亦未能解除生长抑制。

[参考文献]

[1] Janniere L,Breand C,Ehrlich S D. Structurelly stable *B. subtilis* cloning vector [J]. *Gene*,1996,87:53-61.

[2] Ferrari E,Lewis P J. Improved plasmid vectors for the production of the multiple fluorescent protein fusions in *B. subtilis* [J]. *Gene*,2001,264:289-297.

[3] Marcus K,Wiegert M T,Schumann W. Construction and amplication of epitope and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis* [J]. *Apple Environ Microbiol*,2002,68:2624-2628.

[4] Choi-Rhee E,Cronan J E. Biotin synthase is catalytic in vivo,

but catalysis engenders destruction of the protein [J] . *Chem Biol*,2005,12:461-468.

[5] Zhang X Z,Yan X,Cui Z L,et al. mazF,a novele counter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis* [J]. *Nucleic Acids Res*,2006,34(9):e71.

[6] Yang M M,Zhang W W,Zhang X F,et al. Construction and characterization of a novel maltose inducible expression vector in *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnol Lett*,2006,28:1713-1718.

[7] Stok J E,De Voss J J. Expression,purification, and characterization of bioI;A carbon-carbon bond cleaving cytochrome P450 involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subillis* [J]. *Arch Biochem Biophys*,2000,384:351-360.

[8] Green A J,Rivers S L,Cheesman M,et al. Expression,purification and characterization of cytochrome P450 BioI: a novel P450 involved in biotin synthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *J Biol Inorg Chem*,2001,6:523-533.

[9] Green A J,Munro A W,Cheesman M R,et al. Expression,purification and characterisation of a *Bacillus subtilis* ferredoxin: a potential electron transfer donor to cytochrome P450 Bio I [J]. *J Inorg Biochem*,2003,93:92-99.

[10] Webster S P,Alexeev D,Campopiano D J,et al. Mechanism of 8-amino-7-oxononanoate synthase: spectroscopic, kinetic, and crystallographic studies [J]. *Biochem*,2000,39:516-528.

[11] Schneider G,Lindqvist Y. Structural enzymology of biotin biosynthesis [J]. *FEBS Lett*,2001,495:7-11.

[12] Layer G,Heinz D W,Jahn D,et al. Structure and function of radical SAM enzymes [J]. *Chem Biol*,2004,8:468-476.

[13] Berkovitch F,Nicolet Y,Wan J T. The crystal structure of biotin synthase,an s-Adenosylmethionine-dependent radical enzyme [J]. *Science*,2004,303:76-79.

[14] Jarrett J T. The novel structure and chemistry of iron-sulfur clusters in the adenosylmethionine-dependent radical enzyme biotin synthase [J]. *Arch Biochem Biophys*,2005,433:312-321.

[15] Jarrett J T. Biotin synthase,enzyme or reactant? [J]. *Chem Biol*,2005,12:409-415.

[16] Babara H,Wolfgang W,Thomas W,et al. Development of a new integratin site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes [J]. *J Bacteriol*,2001,183:2696-2699.