

# 枯草芽孢杆菌耐盐突变株 *proA* 基因克隆 及 *proBA* 基因渗透压调节功能研究

刘瑞杰 曹军卫\* 苗丽霞

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

**摘 要** 利用 TaKaRa LA PCR™ 试剂盒扩增枯草芽孢杆菌 93151 耐盐突变株 *proA* 基因的未知下游序列。根据测序结果,设计引物,克隆出发菌株和突变株全长 *proBA* 基因。将出发菌株和突变株的 *proBA* 基因分别转化大肠杆菌 JM83 (*proBA*<sup>-</sup>) 均能够与其功能互补。SDS-PAGE 分析其表达产物,有两条分子量分别约为 40kD 和 45kD 的新蛋白带出现。测定 4 种转化子(分别含有出发菌株和突变株 *proB* 基因的大肠杆菌 1.1252 转化子及 *proBA* 基因的大肠杆菌 JM83 转化子)的耐盐能力。发现含有突变株 *proB* 或 *proBA* 基因转化子的耐盐能力,均比相应的含有出发菌株 *proB* 或 *proBA* 基因的转化子高。另外含有出发菌株和突变株的 *proBA* 基因转化子的耐盐能力,也均比相应的仅含 *proB* 基因的转化子高,表明枯草芽孢杆菌的 ProA 比大肠杆菌的 ProA 更为有效。测定所有 JM83 转化子胞内自由脯氨酸,发现其含量随盐浓度的上升而提高,其中含突变菌株 *proBA* 基因的转化子提高更为显著。

**关键词** 枯草芽孢杆菌 耐盐突变株 *proBA* 基因 渗透压胁迫

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0452-05

许多生物通过提高胞内相容溶质的浓度,来适应胞外渗透压的升高。相容溶质包括的种类主要有氨基酸、氨基酸衍生物、多羟基化合物、糖醇、甲胺等<sup>[1]</sup>。其中脯氨酸是许多生物为抵御高渗胁迫,在胞内积累的重要相容溶质之一<sup>[2,3]</sup>。在高渗胁迫条件下,微生物既可以利用胞外吸收,也可以通过胞内合成的方式积累脯氨酸。其合成从谷氨酸开始,经  $\gamma$ -谷氨酸激酶(EC 2.7.2.11,  $\gamma$ -GK 或 ProB)  $\gamma$ -谷氨酸磷酸还原酶(EC 1.2.1.41,  $\gamma$ -GPR 或 ProA)和吡咯啉-5-羧酸还原酶(EC 1.5.1.2, P5CR 或 ProC) 3 种酶催化合成,它们分别由 *proB*、*proA* 和 *proC* 基因编码<sup>[2]</sup>。其中  $\gamma$ -GK 是脯氨酸合成过程中的限速酶,其活性受终产物脯氨酸的反馈抑制。*proB* 基因的突变,可以解除终产物的反馈抑制,从而提高脯氨酸的产量,进一步提高微生物耐高渗胁迫的能力<sup>[4,5]</sup>。

本课题组利用亚硝基胍诱变,筛选到一株抗脯氨酸结构类似物的耐盐突变株。克隆其 *proBA* 基因,序列分析表明,获得了完整的 *proB* 基因和部分 *proA* 基因<sup>[6]</sup>。本研究根据已得到的部分 *proA* 基因序列,进一步克隆出完整的 *proA* 基因,再克隆出发菌株和突变株完整的 *proBA* 基因,研究突变株 *proBA* 基因在体外表达对大肠杆菌耐高渗胁迫能力的影响,进而了解耐渗透压胁迫的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**出发菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)93151 由中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供;枯草芽孢杆菌 93151-14 为本实验室已获得的抗脯氨酸结构类似物耐盐突变株<sup>[6]</sup>;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  由本实验室保存;*E. coli* 1.1252 (*proB*<sup>-</sup>)由本实验室保存;*E. coli* JM83 (*proBA*<sup>-</sup>)由德国 Skerra<sup>[7]</sup>教授赠送;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;pBE2 表达载体由武汉大学沈萍教授赠送;pBV220 表达载体由湖北大学马立新教授赠送。

**1.1.2 主要试剂** 连接酶、限制性内切酶、LA PCR™ in vitro cloning kit 购自 TaKaRa 公司。DNA 回收试剂盒为 MBI 公司产品。

**1.1.3 培养基:**LB 培养基按照文献[8]的方法配制。MM 培养基采用文献[7]的方法制备。

### 1.2 *proA* 基因下游未知序列的扩增与测定

枯草芽孢杆菌出发菌株 93151 与突变株 93151-14 总 DNA 的提取采用林万明<sup>[9]</sup>的方法。TaKaRa LA

基金项目 武汉大学科技创新基金(204270023)

\* 通讯作者。Tel 86-27-87872137; E-mail: caojw@whu.edu.cn

作者简介 刘瑞杰(1978-) 山东临沂人,硕士。研究方向为嗜极微生物分子生物学。E-mail: ruijie\_97@163.com

收稿日期 2003-11-17,修回日期 2004-03-10

PCR<sup>TM</sup> in vitro cloning kit 的原理<sup>[6]</sup>是根据基因已知的上游序列,设计两条上游引物,结合试剂盒中的下游引物 C1 和 C2,以合适的限制性内切酶消化的总 DNA 为模板,采用巢式 PCR 的方法扩增基因的未知下游序列。第一次 PCR 扩增设计的首上游引物为 S1 和 S2,反应体系:95℃ 5min;94℃ 30s,55℃ 2min,72℃ 3min,共 30 个循环;72℃ 10min。S1:5'-TGATCTGCTGGTCAGGGAATCAACCGTACC-3',S2:5'-ATGCCGCTTACTTCCAGACAGCCGTTGACG-3'。用 *Hind*Ⅲ 完全酶切枯草芽孢杆菌总 DNA,纯化后与试剂盒中相应的 *Hind*Ⅲ Cassette 连接,以连接产物为模板,首先使用引物 S1 和试剂盒中的接头引物 C1 进行 PCR,然后以第一次 PCR 的产物为模板,以 S2 和接头引物 C2 进行巢式 PCR 以获得特异性片段。第二次 PCR 扩增根据第一次测序结果合成了 S3 和 S4 两条上游引物,S3:5'-CTGGAGCCTAATGCCAAACAAGCCGAAG-3',S4:5'-CCGAAATCGGCATCAGCAGGCAAAAAGC-3'。反应体系:95℃ 5min;94℃ 30s,55℃ 2min,72℃ 1min,共 30 个循环;72℃ 10min。采用 *Sau*3A I 完全酶切枯草芽孢杆菌总 DNA,纯化后与试剂盒中相应的 *Sau*3A I Cassette 连接,以连接产物为模板,以特异性引物 S3 和接头引物 C1 进行 PCR。然后以获得的 PCR 产物为模板使用引物 S4 和试剂盒中的接头引物 C2 进行巢式 PCR 以获得特异产物。

将每次获得的巢式 PCR 产物回收后连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  筛选出阳性转化子,并送上海 Sangon 公司测序。

### 1.3 *proBA* 基因的功能互补鉴定

采用苗立霞等<sup>[6]</sup>设计的 *proB* 基因上下游引物和 PCR 条件,分别扩增出发菌株和突变株的 *proB* 基因,双酶切后,连接到同样双酶切的 pBE2 表达载体上,转化大肠杆菌 1.1252,在 Amp 抗性平板上筛选出阳性转化子。将含出发菌株 *proB* 基因的转化子命名为 1.1252 (pBE2-*proB*/W),含突变菌株 *proB* 基因的转化子命名为 1.1252 (pBE2-*proB*/M)。将两种转化子涂布于 MM 培养基平板上,37℃ 培养,进行功能鉴定。

根据已得到的完整 *proBA* 基因序列,设计引物,扩增出发菌株与突变株的全长 *proBA* 基因。上游引物为 5'-GGCTCTAGAACGGAGGAGAACTATGAAA-3' (含 *Xba* I 酶切位点),下游引物为 5'-GGCGAGCTCATCGTCAATCTCCCCGCACA-3' (含 *Sac* I 酶切位点)。PCR 反应条件为:95℃ 5min;94℃ 30s,53℃

1min,72℃ 3min,共 30 个循环;72℃ 10min。PCR 产物双酶切后,连接到同样双酶切的 pBE2 载体上,转化大肠杆菌 JM83, Amp 抗性平板筛选阳性转化子。将含出发菌株 *proBA* 基因的转化子命名为 JM83 (pBE2-*proBA*/W),含突变菌株 *proBA* 基因的转化子命名为 JM83 (pBE2-*proBA*/M)。将两种转化子涂布 MM 平板,37℃ 培养,进行功能鉴定。

### 1.4 *proBA* 基因表达产物分析

为研究 *proBA* 基因表达产物的组织形式,利用 PCR 扩增出发菌株和突变株的全长 *proBA* 基因,上游引物:5'-GGCGGATCCGAACTATGAAAAAG-3' (含 *Bam* H I 酶切位点),下游引物:5'-AGCCTGCAGCT-TAAAAAGACT ATAC-3' (含 *Pst* I 酶切位点)。PCR 产物双酶切后,连接到同样双酶切的表达载体 pBV220 上,转化大肠杆菌 JM83。双酶切鉴定阳性转化子,分别命名为 JM83 (pBV220-*proBA*/W) 和 JM83 (pBV220-*proBA*/M)。

参照翟超等<sup>[10]</sup>的方法制备胞内蛋白质样品。

### 1.5 大肠杆菌 1.1252 和 JM83 转化子耐高渗透胁迫能力的测定

分别挑取 1.1252 (pBE2-*proB*/W) 1.1252 (pBE2-*proB*/M) JM83 (pBE2-*proBA*/W) 和 JM83 (pBE2-*proBA*/M) 单菌落,接种到 10mL 含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37℃ 培养 10h,离心收集菌体,用 1mL MM 培养基洗涤两次后,按 1:50 的比例转接到 50mL MM 培养基中,37℃ 培养约 12h 至对数生长期,再按适当比例转接到含不同 NaCl 浓度 (0.6%, 1.2%, 2.4%, 3.6%) 的 50mL MM 培养基中,使初始  $OD_{550}$  值约为 0.03,37℃、220r/min 震荡培养。不同时间测定  $OD_{550}$  值,以培养时间为横坐标,以  $OD_{550}$  值为纵坐标,绘制生长曲线。

### 1.6 胞内自由脯氨酸含量测定

按文献 [11] 的方法测定大肠杆菌 JM83 转化子胞内自由脯氨酸含量。

## 2 结果

### 2.1 *proA* 基因下游序列的扩增和测定

按照材料和方法所述,以 S2 和 C2 为引物做巢式 PCR,产物测序结果表明比苗立霞等<sup>[6]</sup>获得的部分 *proA* 基因序列向下游延伸了 38 个碱基,但仍未发现终止密码子。再根据该测序结果重新设计了两条引物 S3 和 S4,以 S4 和 C2 为引物做巢式 PCR,第二次测序结果显示已经到达了终止密码子 TAG,其后紧接着是一个非典型的终止子结构。根据测序结

果并结合苗丽霞等<sup>[6]</sup>对 *proA* 基因翻译起始位点的推测, *proA* 基因编码区全长为 1248bp( GenBank 登陆号 AY601668 ), 编码一个由 415 个氨基酸组成的蛋白质, 分子量约为 45.65kD, 与枯草芽孢杆菌 16S ProA 同源性高达 80%。ProA 蛋白 Ala<sup>141</sup>—Asp<sup>173</sup> 推测是一个 NADPH 的结合区域<sup>[12]</sup>。

2.2 *proBA* 基因的功能互补鉴定

根据材料和方法所述, 采用 PCR 分别扩增出发菌株和突变株的 *proBA* 基因, 连接到 pBE2 载体上, 转化 JM83, 获得的阳性转化子 37℃ 培养, 33h 后均能在 MM 上长出菌落, 第二次划线于 MM 进一步鉴定, 10h 就可以观察到转化子生长。而仅含 pBE2 空载体的转化子, 不能在此培养基上生长。说明从出发菌株和突变株扩增的全长 *proBA* 基因均能够与 JM83 功能互补, 使其恢复生长。

PCR 方法获得的出发菌株和突变株 *proB* 基因, 连接到 pBE2 表达载体上, 转化 1.1252, 在 MM 培养基上也能够生长, 表明所克隆的 *proB* 基因也能够与 1.1252 功能互补。

2.3 *proBA* 基因表达产物分析

含有 *proBA* 基因的重组质粒在 JM83 中热诱导表达, SDS-PAGE 显示有两条新的蛋白带出现( 图 1 ), 与通过核苷酸序列计算出的 ProB( 40.7kD ) 和 ProA( 45.6kD ) 蛋白分子量基本一致。表明 93151-14 的 *proBA* 基因尽管是以重叠的方式组织的, 但可能仍以分离的方式表达 ProB 和 ProA 两个蛋白, 这与 *Serratia marcescens*<sup>[5]</sup> 和 *Escherichia coli*<sup>[15]</sup> 等菌株 *proBA* 基因的表达方式相同。初步推测 *proBA* 基因是一个操纵子。

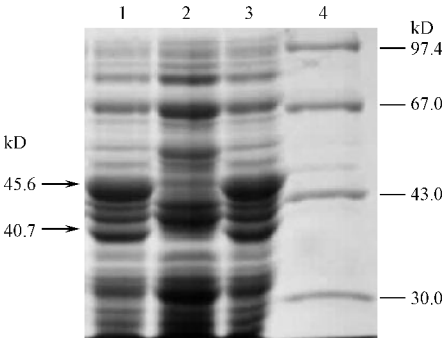


图 1 JM83( pBV220-*proBA*/W )和 JM83( pBV220-*proBA*/M )表达产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression products of JM83( pBV220-*proBA*/W ) and JM83( pBV220-*proBA*/M )

1. JM83( pBV220-*proBA*/W ); 2. JM83( pBV220 ); 3. JM83( pBV220-*proBA*/M ); 4. Protein marker.

2.4 *proBA* 基因突变对宿主菌耐高渗胁迫能力的影响

为研究 *proBA* 基因的突变对宿主菌耐高渗胁迫能力的影响, 将 4 种转化子分别接种在含不同 NaCl 浓度的液体 MM 中培养。

图 2 显示, 随着盐浓度的升高, 1.1252 两种转化子均表现出生长的延迟期和到达稳定期的时间延长。在 1.2% 时 1.1252( pBE2-*proB*/W )已不能生长, 而 1.1252( pBE2-*proB*/M )不仅在此盐浓度下还可以生长, 在 1.6% 仍有缓慢生长。此外, 在相同的 NaCl 浓度( 0.6% 和 1.2% )下, 1.1252( pBE2-*proB*/M )均比 1.1252( pBE2-*proB*/W )生长的延迟期短得多, 生长明显要快。说明 *proB* 基因的突变确实能够赋予 1.1252 更高的耐渗透胁迫的能力。

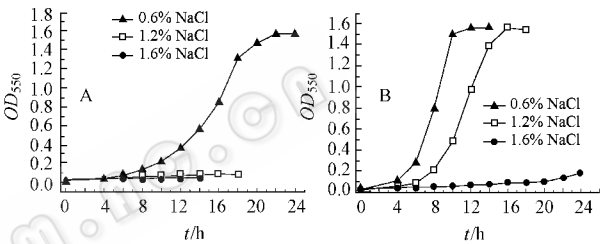


图 2 不同盐浓度下的生长曲线

Fig.2 Growth curve in different salt concentrations

A. 1.1252( pBE2-*proB*/W ); B. 1.1252( pBE2-*proB*/M ).

图 3 显示, 随着盐浓度的升高, JM83 两种转化子也表现出生长的延迟期和到达稳定期的时间延长。在 2.4% NaCl 时 JM83( pBE2-*proBA*/W ) *OD*<sub>550</sub> 值基本上没有什么变化, 说明它在此高渗条件下不能生长, 而 JM83( pBE2-*proBA*/M )却能在此盐浓度下缓慢生长。在 3.6% 时两者都不能生长。在 0%, 1.2% 的盐浓度时, JM83( pBE2-*proBA*/M )比 JM83( pBE2-*proBA*/W )生长要快, 代时要短, 说明两者耐渗透胁迫的能力明显不同, 突变的 *proBA* 基因确实提高了 JM83 耐高渗胁迫能力。此外, 无论是含有枯草芽孢杆菌出发菌株还是突变株 *proBA* 基因的大肠杆

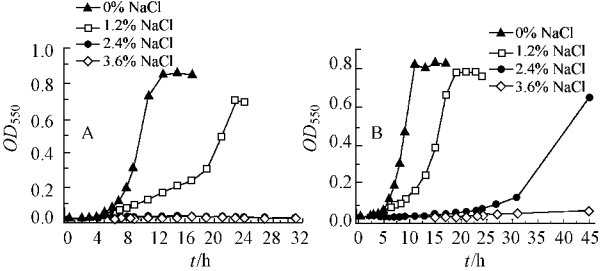


图 3 不同盐浓度下的生长曲线

Fig.3 Growth curve in different salt concentrations

A. JM83( pBE2-*proBA*/W ); B. JM83( pBE2-*proBA*/M ).

菌转化子 均比仅含有 *proB* 基因的大肠杆菌转化子的耐盐能力要强。推测重组质粒表达的 ProA 水平可能高于大肠杆菌 1.1252 中的本底 ProA 水平。

许多生物胞内自由脯氨酸的含量均随着外界渗透压的升高而增加<sup>[17]</sup>。Smith 等<sup>[18]</sup>报道 *E. coli* *proB*-74 的突变,导致其在 0.5mol/L NaCl 环境生长时,胞内自由脯氨酸的含量是出发菌的 17 倍。图 4 表示不同盐浓度下培养时, JM83 转化子胞内自由脯氨酸含量。因在 2.4% NaCl 时, JM83( pBE-*proBA*/W) 没有生长,故没有测其胞内脯氨酸含量。可以看出,在 0% NaCl 时, JM83( pBE2-*proBA*/M) 和 JM83( pBE2-*proBA*/W) 胞内脯氨酸的含量基本一致;在 1.2% NaCl 时,两种菌胞内的自由脯氨酸含量均升高,但 JM83( pBE2-*proBA*/M) 提高的更为显著;在 2.4% NaCl 时, JM83( pBE2-*proBA*/M) 胞内脯氨酸的含量比在 1.2% 盐浓度下生长时提高了 3.6 倍(图 4)。这种脯氨酸提高倍数的差异,可能是 JM83( pBE2-*proBA*/M) 更耐高渗胁迫的原因。

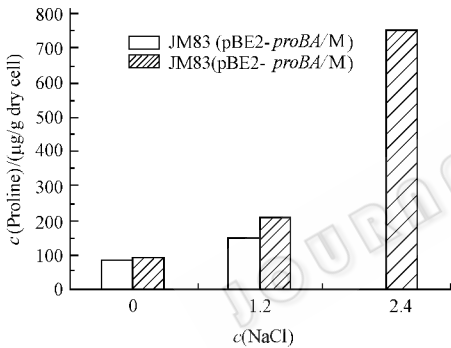


图 4 JM83 pBE2-*proBA*/W 和 JM83 pBE2-*proBA*/M 在不同盐浓度下胞内自由脯氨酸含量比较

Fig.4 Comparison of intracellular free proline contents between JM83 (pBE2-*proBA*/W) and JM83( pBE2-*proBA*/M) in different salt concentrations

### 3 讨论

本研究在获得突变株的基础上,进一步克隆得到了完整的 *proA* 基因序列。研究过程中,曾经将不带终止子的 *proBA* 基因转到没有终止子的载体 pBE2 上,结果转化子 JM83 不能在 MM 培养基上生长,说明其终止子结构是其表达所必须的。

在细菌中,大多数的 *proBA* 基因以一长度不同的连接区或者部分重叠的方式组成一个操纵子。例如,有研究发现在 *Listeria monocytogenes* 中, *proBA* 基因是以重叠的方式组织,两基因重叠了 17bp<sup>[19]</sup>。对 93151-14 的 *proBA* 基因的序列分析发现, *proB* 和

*proA* 基因头尾重叠 4bp, *proBA* 基因的这种紧密组织方式可能有利于  $\gamma$ -GK 和  $\gamma$ -GPR 相互靠近,以复合体的形式共同起作用<sup>[1, 49]</sup>。

本研究发现 93151-14 的 *proBA* 基因尽管是以重叠的方式组织的,但仍以分离的 ProB 和 ProA 两个蛋白方式表达。Meijer<sup>[1]</sup>曾将 *E. coli* 中 *proB* 基因的终止密码子 TAA 去除,使其与 *proA* 基因融合为人工的双功能酶  $\gamma$ -GK/ $\gamma$ -GPR,该酶使 *E. coli* 中胞内脯氨酸含量显著升高,增强了 *E. coli* 在高盐环境下的生长能力。目前,本室已构建了融合的 *proBA* 基因,其在大肠杆菌内的表达使得耐盐能力进一步提高,以及在植物体内的表达也已在进行之中,此研究结果将另文发表。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Meijer P J , Gösta L , Niklas H , et al . An artificial bifunctional enzyme ,  $\gamma$ -glutamyl kinase/ $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase , improves NaCl tolerance when expressed in *Escherichia coli* . *Biotechnol Lett* , 1996 , **18** ( 10 ) : 1133 - 1138 .

[ 2 ] Omori K , Suzuki S I , Imai Y , et al . Analysis of the *Serratia marcescens proBA* operon and feedback control of proline biosynthesis . *J Gen Microbiol* , 1991 , **137** : 509 - 517 .

[ 3 ] Nanjo T , Kobayashi M , Yoshiba Y , et al . Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana* . *Plant J* , 1999 , **18** ( 2 ) : 185 - 193 .

[ 4 ] Csonka L N , Gelvin S B , Goodner B W , et al . Nucleotide sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress . *Gene* , 1988 , **64** : 199 - 205 .

[ 5 ] Omori K , Suzuki S I , Imai Y , et al . Analysis of the mutant *proBA* operon from a proline-producing strain of *Serratia marcescens* . *J gen Microbio* , 1992 , **138** : 693 - 699 .

[ 6 ] 苗丽霞 , 曹军卫 , 刘瑞杰 . 枯草芽孢杆菌抗脯氨酸结构类似物突变株的筛选及突变株 *proBA* 基因的克隆和序列分析 . 遗传学报 , 2002 , **29** ( 12 ) : 1111 - 1117 .

[ 7 ] Fiedler M , Skerra A . *proBA* complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment . *Gene* , 2001 , **274** : 111 - 118 .

[ 8 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning : A Laboratory Manual , 2<sup>nd</sup> ed , New York : Cold Spring Harbor Press Laboratory Press , 1989 .

[ 9 ] 林万明 . 细菌分子遗传分类鉴定法 . 上海 : 上海科学技术出版社 , 1990 : 52 - 54 .

[ 10 ] 翟超 , 曹军卫 . 碱性果胶酶基因 *PelA* 在 *E. coli* 中的表达和酶学性质研究 . 武汉大学学报 , 2001 , **47** : 477 - 480 .

[ 11 ] Whatmore A M , Chudek J A , Reed R H . The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis* . *J gen microbiol* . 1990 , **136** : 2527 - 2535 .

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 12 ] Savouré A , Jaoua S , Hua X J , *et al.* Isolation , characterization , and chromosomal location of a gene encoding the  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana* . *FEBS Lett* , 1995 , **372** : 13 – 19 .
- [ 13 ] Massarelli I , Forlani G , Ricca E , *et al.* Enhanced and feedback-resistant  $\gamma$ -glutamyl kinase activity of an *Escherichia coli* transformant carrying a mutated *proB* gene of *Streptococcus thermophilus* . *FEMS Microbiol Lett* , 2000 , **182** : 143 – 147 .
- [ 14 ] Dandekar A M , Uratsu S L . A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance . *J Bacteriol* , 1988 , **170** ( 12 ) : 5943 – 5945 .
- [ 15 ] Deuth A H , Rushlow K E , Smith C J . Analysis of the *Escherichia coli proBA* locus by DNA and protein sequencing . *Nucleic Acids Res* , 1984 , **12** ( 15 ) : 6337 – 6355 .
- [ 16 ] Smith C J , Deuth A H , Rushlow K E . Purification and characteristics of a  $\gamma$ -glutamyl kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis . *J Bacteriol* , 1984 , **157** ( 2 ) : 545 – 551 .
- [ 17 ] Sugiura M , Kisumi M . Proline-hyperproducing strains of *Serratia marcescens* : enhancement of proline analog-mediated growth inhibition by increasing osmotic stress . *Appl Environ Microbiol* , 1985 , **49** ( 4 ) : 782 – 786 .
- [ 18 ] Smith L T . Characterization of  $\gamma$ -glutamyl kinase from *Escherichia coli* that confers proline overproduction and osmotic tolerance . *J Bacteriol* , 1985 , **164** ( 3 ) : 1088 – 1093 .
- [ 19 ] Roy D S , Cormac G M G , Colin H . Identification and disruption of the *proBA* locus in *Listeria monocytogenes* : role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection . *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** ( 6 ) : 2571 – 2577 .

## ***proA* Gene Cloning and Function Analysis of *proBA* Gene in Osmoregulation from A Salt-tolerant Mutant of *Bacillus subtilis***

LIU Rui-Jie   CAO Jun-Wei\*   MIAO Li-Xia

( College of Life Science , Wuhan University , Wuhan 430072 , China )

**Abstract :** The unknown downstream sequence of the *proA* gene from a salt-tolerant mutant of *Bacillus subtilis* 93151 was cloned using TaKaRa LA PCR<sup>TM</sup> in vitro cloning kit . Based on the sequencing result , primers were designed to amplify the complete *proBA* genes from 93151 and its mutant . *proBA* gene expression could complement the proline auxotrophy *E. coli* JM83 . Analysis of *proBA* gene products using SDS-PAGE showed that two independent novel proteins with molecular weights of 40kD ( ProB ) and 45kD ( ProA ) appeared . The salt-tolerance of the four transformants ( 1.1252 containing *proB* genes and JM83 carrying *proBA* genes from 93151 and its mutant ) were examined . This showed that transformants containing the *proB* or *proBA* gene from the mutant were more resistant to osmotic stress than those from 93151 , indicating that the mutation in *proB* gene assuredly improved their resistance to osmotic stress . Besides , JM83 transformants harbouring *proBA* genes were also more salt-tolerant than 1.1252 transformants with just *proB* genes , suggesting that ProA of *B. subtilis* is more effective than that of *E. coli* . Intracellular free proline levels of JM83 transformants increased in response to the elevated salt concentrations , and the proline contents of JM83 transformant carrying the mutated *proBA* gene enhanced more remarkably than that of JM83 transformant carrying the *proBA* gene from 93151 . It suggests that the improvement in osmotolerance of JM83 transformant carrying the mutated *proBA* gene relates closely with the accumulation of intracellular free proline .

**Key words :** *Bacillus subtilis* , Salt-tolerant mutant , *proBA* gene , Osmotic stress