

枯草芽孢杆菌基因启动子的分离与鉴定

潘 皎 张义正*

(四川大学生命科学学院 四川省分子生物学及生物技术重点实验室 成都 610064)

摘 要:利用启动子探针型载体 pSUPV4 直接在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分离枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600 的基因启动子片段,获得 55 个具有卡那霉素抗性的重组子。对 3 个抗性最高的重组子 pSU-Bs2, pSU-Bs4, pSU-Bs8 进行序列测定和同源性分析发现,所克隆到的基因启动子片段均来自于枯草芽孢杆菌的基因组,并且具有枯草杆菌基因启动子的保守序列。对抗性最高的 Bs2 片段进一步研究表明,它可以在大肠杆菌中高效地启动来自于短小芽孢杆菌的碱性蛋白酶基因的表达,也能在枯草芽孢杆菌中启动卡那霉素抗性基因的表达。

关键词:枯草芽孢杆菌 大肠杆菌 基因启动子克隆 启动子探针型载体 序列分析

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0457-04

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)WB600 是一株 6 种蛋白酶基因都发生了突变的菌株^[1],分别为中性蛋白酶 A、枯草溶菌素、胞外蛋白酶、金属蛋白酶、杆菌肽酶 F 和中性蛋白酶 B。该菌株胞外蛋白酶活力仅为野生菌的 0.32%,因此将它作为基因工程宿主菌来表达外源蛋白具有以下优点(1)外源蛋白可直接被分泌到细胞外的培养基中,这不仅大大降低了某些外源基因的表达产物对宿主细胞可能存在的毒害作用,而且易于外源蛋白的分离纯化。(2)该菌株为 6 种蛋白酶缺陷型,不仅有助于提高外源基因表达蛋白的产量,而且有助于提高表达蛋白的稳定性。所以将该菌株作为基因工程宿主菌来表达外源蛋白具有很大的潜力。为了利用该菌株构建我室已克隆到的短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因^[2]的高效表达系统,我们从该菌株基因组中分离到多个强的基因启动子。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,其基因型为 *supE44(lacU169(φ80lacZΔM15)hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*,本室保存;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)WB600, Cm^R(*trpC2 nprA apr epr bpf mpr nprB*) 6 种蛋白酶的突变株。由加拿大 Calgary 大学 Dr. Wong 惠赠;启动子探针型载体 pSUPV4^[3](3.8kb)和 *E. coli-B. subtilis* 穿梭载体

pSUGV4^[4](6.0kb)均由本实验室构建。

1.1.2 分子克隆工具酶及生化试剂:限制性内切酶 RNaseA,蛋白酶 K,牛小肠碱性磷酸酶(CIP),T4 DNA 连接酶,*E. coli* DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 片段),*Taq* DNA 聚合酶等购自德国 BM 公司和美国 Gibco-BRL 公司。其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 DNA 操作技术

除特别注明出处外,所用的 DNA 操作技术均采用已经规范化的研究方法^[5]。枯草杆菌的转化采用原生质体转化方法^[6]。

1.3 DNA 序列测定

由 TaKaRa 公司完成 DNA 序列测定。DNA 序列分析采用 DNAsis 软件。

2 结果和分析

2.1 利用启动子探针型载体 pSUPV4 筛选枯草杆菌启动子的策略

将枯草杆菌(*B. subtilis*)WB600 的总 DNA 用 *Sau3AI* 部分酶切,使酶切片段主要集中在 0.5~5kb 之间。启动子探针型载体 pSUPV4 用 *Bam*H I 完全酶切,并脱磷酸化处理,再与上述总 DNA 部分酶切片段以适当比例连接,转化大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α ,转化细胞先涂布在氨苄青霉素(100 μ g/mL)平板上,再将转化子点在卡那霉素的平板上,筛选阳性菌落。

2.2 枯草杆菌基因启动子的克隆

在氨苄青霉素平板上共得到约 10000 个 Ap^r 转

基金项目:国家 863 计划(2001AA214181)

* 通讯作者。Tel 86-28-85412738, E-mail: nic3602@scu.edu.cn

作者简介:潘皎(1977-),女,安徽省蒙城县人,博士,主要从事短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的表达研究。E-mail:apan_@163.com

收稿日期:2003-12-09,修回日期:2004-03-29

化子,从中随机挑选 1000 个转化子点在卡那霉素 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板上,共获得 55 个 Kan^r 阳性菌落,依次命名为 pSU-Bs1 至 pSU-Bs55。从随机挑取的 32 个抗性菌落中分离质粒 DNA,经 *Hind* III 限制酶酶切和琼脂糖电泳分析,表明各质粒均有大小不等的 DNA 插入片段,大小在 300 ~ 1200bp 之间。将获得的 55 个阳性菌落分别接种在 400、800、1000 和 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素平板上,检查其抗性水平。

表 1 部分重组子中插入片段的大小与其卡那霉素抗性水平的关系

Table 1 The size of the inserted DNA fragments and the level of kanamycin-resistance of some recombinants

DNA fragment	Bs2	Bs3	Bs4	Bs8	Bs10	Bs13	Bs17	Bs20	Bs21
Fragments size/bp	500	580	800	250	480	1200	700	1100	1000
Kanamycin resistance($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2000	1000	1500	1500	1000	1000	1000	1000	1000

2.3 序列测定和分析

对插入片段 Bs2、Bs4、Bs8 进行了序列测定,结果(图 1)显示,启动子片段 Bs2 长 498bp。将此序列与枯草杆菌全基因组进行同源性比较,同源性高达 98%。同源性分析发现,Bs2 的 1 ~ 363bp 区段位于 *yecK* 基因编码区的 3' 端,在 361bp 处为 *yecK* 基因的终止密码子 TAA,而 Bs2 的 460 ~ 498bp 区段位于 *yecL* 基因编码区的 5' 端,在 460bp 处为 *yecL* 基因的起始密码子 TTG。推测中间区段即为启动子区

实验表明,随卡那霉素浓度的增高,阳性克隆数减少,其中 9 个转化子卡那霉素抗性可达 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。选取这 9 个转化子,提取质粒经 *Hind* III 限制酶酶切和琼脂糖电泳分析,发现插入片段的大小与卡那霉素抗性水平高低没有相关性(表 1)。进一步实验还表明 pSU-Bs2、pSU-Bs4、pSU-Bs8 可在 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素平板上很好地生长,pSU-Bs2 甚至可在 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素平板上生长。

域 根据已知的枯草杆菌的启动子序列对中间的这段序列进行分析,发现有与 σ^E 的识别序列相似的序列,在 392bp 处有一个序列 CAATTACAAT,在其上游 14bp 处有一个序列 TTATAAA,推测这就是在 Bs2 中具有启动功能的启动子结构。起始密码子 TTG 下游多出 12 个氨基酸再与卡那霉素抗性基因编码区发生融合,后者阅读框架没有发生改变,因此不影响卡那霉素抗性基因的表达。*yecK* 与 *yecL* 这两个基因的功能尚未知。

```

Bs2 1 CGTCTCAATG C ATACGGGAT GACAGCTGCT GGAGCTGCCA TGATGCTTTA CACAGGGATA AAATCGGGCG CTGGCATGAA TACGCCAATG
91 GCAGCATATC CGCTTTCTAT GTATGGTTTG TTCGCAGTAA TTGCAGTCGT TACCACAGTG ATTCCATTG TGCTAATGCT TGAGGGCATA
181 AAACGAATCG GGGCACACCG AGCCGCCGCC ATTTCAATGG CAGGGCCTAT CCTGACGATT TTCTATGGAG CTTTATTTCT CGTGAAACGG
271 CTCGGGCTCA TTCAAGTCAT TGGATGCGGT GCGTATTTT TTGTCATTAC GGGCATGGAA TACAGGAAGC TGAACACAGG AAAAAAGAA
361 TAA TTTTAT AAAACACACA CGTTTTTCAA TTACAATAAG TGTAATTACG GTGTGTTTT TTGATTTTGT AAAGGTTAGG TGAGGAGATG
451 CAGCGCATAT TGCTTG TAGA AGACGACCAC TCAATCAGTG AAATGGTG

Bs4 1 AGACCAATCT CATCGCGGA CAAAATGTGG TGGAAGCTGC CCTTTCACAC CGAGTGCAGC ATGTCATTAA TATCAGTACA ATAAAGCTG
91 TATAT TAA GA TACTTACTAC ATATCTAACG AAAAAAGAA GCTTACTCTG CCTTCCTTTC CAGAGCAGCT TCTAATAAAT
181 GTTGAGCAAA TTGTTTATAA AACTCATCTA AGTCATTACT TGCTTCATCC TGAGTTATAT ATCGAATACT GTAATTTTCT
271 TTCTGGACTA CCTTTATTGT TTTTTCTTT AATTCCTCAT AACGTTGGTA AGGTTCCAAG GCTACACCCC CGTTTTTACA
361 GGAGTATTAT ATGTATGTAA TGTTTGCT CTTGACTGTT CTTTCTTAAT TAGTCCCG CAAAGCTTGT TTAATAATA
451 TGTATAATC ACITTCITTT TCATCGAGCG CACTFCAGTA CCGATTCTT CACAAATCGC AATCGGGATA CTGGCTTTGT
541 TTACTTTATT CTTATATGTA TGTTTCAACT GTTTTCAGC TATGTTCTTA TATGTAAGGA AATCATTAAAT ATGTACGAAA
631 TAAACTTTGT TTTCCGGCTC TCTAAATTGA AACAGAAAAC CAGGGATTAT GTTTGGGTTA TTGTTTGCT TCCCTTAA
721 TATTTAATCT GCTGCGGCT TATGATTTC TCGTGAAGG AAATGGACTT GCTTTTGTG GACTTAAGCT CAAAGGGGA
811 ACAAGTTACC CCTTAAAGAA CAGAA

Bs8 1 AGACAGCACA GCCTCCAGAA TTTGATTGCT CTTAACGGCT TTCCCATCC ATCAGGCGCG AACGGCCATC GTTTGAAACA ATTCAGCAAA
91 AACAAAGAGC AACTAGAAAG ACAATTCGT121 TCCTTTGCTG CATTGGTTGA TTTCGCTATA GAAAAGAGGA AATAAAAGGG
181 ATATGATAAA CAAAACACA AACGTGGGA GTGGTTGAA TTTTCCTATA TTAGAAACG

```

图 1 Bs2、Bs4、Bs8 片段的核苷酸序列

Fig. 1 The nucleotide sequence of Bs2, Bs4, Bs8 fragments

启动子片段 Bs4 长 755bp。将此序列与枯草杆菌全基因组进行同源性比较,同源性高达 97%。同源性分析发现,Bs4 的 1~98bp 区段位于 *yodU* 基因编码区的 3' 端,在 96bp 处为 *yodU* 基因的终止密码子 TAA。根据已知的枯草杆菌的启动子序列对序列进行分析,发现有与 σ^A 的识别序列相似的序列,在 653bp 处有一个类似于 TATA 盒的序列 TTTAAT,在其上游 16bp 处有一个与 TTGACA 盒相似的序列 TTCTGT,推测这就是在 Bs4 中具有启动功能的启动子结构。在 672bp 处为起始密码子,下游多出 27 个氨基酸再与卡那霉素抗性基因编码区发生融合,后者阅读框架没有发生改变,因此不影响卡那霉素抗性基因的表达。*yodU* 基因的功能尚未知。

启动子片段 Bs8 长 229bp。将此序列与枯草杆菌全基因组进行同源性比较,同源性高达 100%。同源性分析发现,Bs8 的 1~165bp 区段位于 *yoxB* 基因编码区的 3' 端,在 162bp 处为 *yoxB* 基因的终止密码子 TAA,而 Bs8 的 209~229bp 区段位于 *yoaA* 基因编码区的 5' 端,在 209bp 处为 *yoaA* 基因的起始密码子 ATG。推测中间区段即为启动子区域,根据已知的枯草杆菌的启动子序列对中间的这段序列进行分析,发现有与 σ^H 的识别序列相似的序列,在 189bp 处有一个序列 CAAAC,在其上游 14bp 处有一个序列 AAGGGATAT,推测这就是在 Bs4 中具有启动功能的启动子结构。起始密码子下游多出 6 个氨基酸再与卡那霉素抗性基因编码区发生融合,后者阅读框架没有发生改变,因此不影响卡那霉素抗性基因的表达。*yoxB* 与 *yoaA* 这两个基因的功能尚未知。

2.4 Bs2 片段在大肠杆菌中进一步的功能验证

将抗性最高的 Bs2 片段与短小芽孢杆菌的碱性蛋白酶基因 AP 的编码区融合,并且将融合基因插入 pSUGV4 中,构建了重组子 pSU-BsAp。将该重组

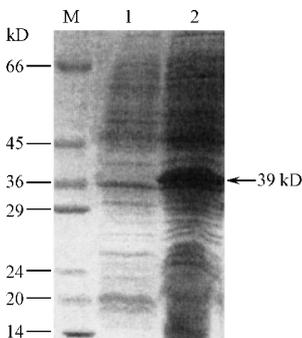


图 2 转化子 pSU-BsAp/*E. coli* 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the transformant pSU-BsAp/*E. coli*
M. Marker; 1. *E. coli* DH5 α ; 2. pSU-BsAp/*E. coli*.

子转入大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 中,获得转化子 pSU-BsAp/*E. coli*。将该转化子 37 $^{\circ}$ C 培养 18h,收集菌体。SDS-PAGE 结果表明,Bs2 片段可以在大肠杆菌中高效地启动短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的表达,表达的蛋白质大小约为 39kD,与预期的大小相符(图 2)。Bs2 片段能否在枯草杆菌中启动该基因的表达还在进一步研究中。

2.5 Bs2 片段在枯草杆菌 WB600 中的功能验证

为了证明在大肠杆菌中分离得到的枯草杆菌基因启动子片段能在原供体菌中具有启动功能。先将 pSU-Bs2 用 *Nde* I 进行酶切后,再用 T4 DNA 聚合酶补平。然后与来自 *E. coli*-*B. subtilis* 的穿梭载体 pSUGV4 中 2.3kb 长的枯草杆菌的复制起点片段相连。将获得的重组子转化枯草杆菌 WB600,在 Kan^r 为 20 μ g/mL 的平板上有抗性菌落长出。将获得的阳性菌落分别接种在 40、60、80 和 100 μ g/mL 的卡那霉素平板上,检查其抗性水平。实验表明,阳性菌落最高可在 80 μ g/mL 的卡那霉素平板上生长。由此证明了在大肠杆菌中分离得到的枯草杆菌基因启动子片段能在原供体菌中启动卡那霉素抗性基因的表达。

3 讨论

本实验室所构建的启动子探针型载体的 pSUPV4 的卡那霉素抗性基因来自质粒 pNG35 中的 Tn903,该基因中的启动子,基因编码区 5' 端的 30 个核苷酸已经全被除去,该缺失基因上游有一个多克隆位点区^[3]。当一段外源 DNA 片段插入 pSUPV4 中的任意一个克隆位点时,只要当这个片段同时满足以下几个条件时才能形成有功能的卡那霉素抗性融合基因(1)插入方向正确(2)具有基因启动子序列(3)具有翻译起始区(4)具有起始密码子(5)两基因片段所含编码区融合时相位保持一致。

本实验室曾利用启动子探针型载体 pSUPV4 分别从其它细菌^[7]、真菌^[8]、植物^[9]中克隆到了多个具有强启动功能的启动子。我们此次获得的启动子片段还需要进一步进行缩小的亚克隆,以确定启动子的精确位置。Bs2 在枯草杆菌 WB600 中也能启动卡那霉素抗性基因的表达,但卡那霉素抗性水平比在大肠杆菌中低的多。推测可能由以下原因造成(1)在枯草杆菌载体中用来做为选择标记的卡那霉素抗性基因多来自于革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的质粒 pUB110^[10]。启动子探针型载体 pSUPV4 中的卡那霉素抗性基因来自于革兰氏阴性菌大肠杆菌,该基因在大肠杆菌和枯草杆菌中翻译时可能存在着密码子偏爱性的问题。(2)大肠杆菌和枯草杆菌作为宿主菌对卡那霉素的耐受性可能也存在着差别,所以 Bs2 片段在枯草杆菌中是否具有强启动功能还需要进一步验证。

在以枯草杆菌 WB600 作为宿主菌来表达外源蛋白的研究中,使用较多的启动子有组成型表达的双启动子 P43^[11,12]、需要蔗糖诱导表达的果聚糖蔗糖酶基因 SacB 的启动子^[13,14]以及解淀粉芽孢杆菌 α 淀粉酶基因的启动子^[15,16]。枯草杆菌的已知的 σ 因子有 12 种,而它们识别的启动子序列又各不相同。本研究克隆到的 Bs2 片段含有被 σ^E 识别的序列, Bs4 片段含有被 σ^A 识别的序列, Bs8 片段含有被 σ^H 识别的序列,这 3 个启动子片段负责转录不同的基因。此研究作为枯草杆菌功能基因组学方面的研究提供了一定的实验数据。

参 考 文 献

- [1] Wu X C, Lee W, Tran L, et al. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular protease. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(6): 4952 - 4958.
- [2] Huang Q, Peng Y, Zhang Y Z, et al. Purification and characterization of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current Microbiology*, 2003, **46**: 169 - 173.
- [3] 张义正, 林峰, 胥成浩. 大肠杆菌基因启动子探针型载体的构建. *四川大学学报(自然科学版)*, 1998, **35**(2): 263 - 267.
- [4] 刘成君, 张义正. 大肠杆菌——枯草杆菌穿梭质粒载体 pSUGV4 的构建. *四川大学学报(自然科学版)*, 2001, **38**(2): 243 - 246.
- [5] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Shing C, Stanley N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol Gen Genet*, 1979, **168**: 111 - 115.
- [7] 孙迅, 张义正. 环状芽孢杆菌基因启动子的分离与鉴定. *四川大学学报(自然科学版)*, 1995, **32**(2): 207 - 212.
- [8] 李维, 张义正. 黄孢原毛平革菌基因启动子的分离与鉴定. *生物工程学报*, 2000, **16**(5): 599 - 602.
- [9] 王海燕, 张义正. 利用大肠杆菌克隆在原核生物中有活性的油菜基因启动子. *植物学报*, 1999, **41**(5): 494 - 497.
- [10] Masazumi M, Yoshio K, Tadayuki I, et al. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmide from thermophilic bacillus in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *Journal of Bacteriology*, 1984, **160**(1): 413 - 420.
- [11] Wang P Z, Roy H D. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* σ^{55} and σ^{37} RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, **259**(13): 8619 - 8625.
- [12] Yang S, Huang H, Zhang R, et al. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif*, 2001, **21**(1): 60 - 64.
- [13] Michel S, Dominique L C, Stephane A, et al. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet*, 1985, **200**: 220 - 228.
- [14] Wong S L, Ye R, Nathoo S, et al. Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(2): 517 - 523.
- [15] Palva I. Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene*, 1982, **19**: 81 - 87.
- [16] Palva I, Paivi L, Leevi K, et al. Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1983, **22**: 229 - 235.

Cloning and Characterization of Gene Promoters from *Bacillus subtilis*

PAN Jiao ZHANG Yi-Zheng*

(College of Life Science, Sichuan University, Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Chengdu 610064, China)

Abstract: DNA fragments obtained from *Sau3AI* partially digested total DNA of *Bacillus subtilis* WB600 were inserted into *Bam*H I site of pSUPV4, a promoter-probe vector. The recombinant DNA molecules were transformed into *Escherichia coli* cells and 55 Kan^r clones (named pSUBs1- pSUBs55) were obtained. The inserted fragment in pSUBs2, pSUBs4, pSUBs8, which showed high level of kanamycin-resistance, were sequenced and analyzed, respectively. These fragments contain some conserved sequences of gene promoters from *B. subtilis*. The promoter fragment Bs2 can efficiently promote the alkaline protease gene of *B. pumilus* expression in *E. coli* cells. It can also promote kanamycin resistance gene expression in *B. subtilis* cells.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, Promoter cloning, Promoter-prob vector Sequence analysis

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2001AA214181)

* Corresponding author. Tel: 86-28-85412738, E-mail: nic3602@scu.edu.cn

Received date: 12-09-2003