

渗透压调节基因 *proBA* 的融合表达对大肠杆菌 耐高渗胁迫能力的影响

刘瑞杰 陈 婷 曹军卫*

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘 要 枯草芽孢杆菌 93151 的渗透压调节基因 *proB* 和 *proA* 以重叠基因的方式组织,但是表达两个单独的蛋白质 ProB 和 ProA。通过引物设计,在抗脯氨酸反馈抑制耐盐突变菌株 93151-14 的 *proBA* 基因重叠区引入一个限制性酶切位点,分别扩增出 *proB* 和 *proA* 基因,并构建融合的 *proBA* 基因。SDS-PAGE 分析显示有一条新的分子质量约为 85kD 的蛋白带出现。相对于表达未融合的 *proB* 和 *proA*,*proBA* 融合基因的表达明显提高了宿主菌大肠杆菌 JM83 胞内游离脯氨酸含量和其耐高渗胁迫能力。

关键词 枯草芽孢杆菌 脯氨酸 融合基因 耐高渗胁迫能力

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)01-0023-04

脯氨酸是许多生物(如细菌^[1]、藻类^[2]、以及高等植物^[3])为适应胞外水势的降低而在胞内积累的相容溶质。微生物在高渗胁迫条件下,既可以利用胞外吸收,也可以通过胞内从头合成的方式积累脯氨酸。其合成以谷氨酸为底物,经 γ -谷氨酸激酶(γ -GK 或 ProB, EC 2.7.2.11), γ -谷氨酸磷酸还原酶(γ -GPR 或 ProA, EC 1.2.1.41)和吡咯琳-5-羧酸还原酶(P5CR 或 ProC, EC 1.5.1.2) 3 种酶催化合成,它们分别由 *proB*、*proA* 和 *proC* 基因编码^[1]。高等植物中,脯氨酸的合成也以谷氨酸为底物,由吡咯琳-5-羧酸合成酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS)和吡咯琳-5-羧酸还原酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase, P5CR)催化合成,其中 P5CS 具有细菌中 γ -GK 和 γ -GPR 的双重功能^[4]。P5CS 在转基因植物中的表达,显著提高了植物的耐高渗胁迫能力^[5,6]。

在大多数的细菌中, *proB* 和 *proA* 基因在基因组中紧密连锁,组成了一个操纵子,由 *proB* 基因的启动子负责 *proBA* 基因的转录。不同的微生物中, *proB* 和 *proA* 基因的组织方式是不同的,一般以长度不同的连接区或者部分重叠的方式组织。如大肠杆菌的 *proB* 和 *proA* 基因相隔 11 个碱基^[7],而在单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)中, *proB* 与 *proA* 基因重叠了 17 个碱基^[8]。这种重叠的基因组织方式可能有利于 γ -GK 和 γ -GPR 相互靠近,以复合体的形式共同起作用^[8,9]。

本室获得了枯草芽孢杆菌抗脯氨酸结构类似物耐盐突变株 93151-14,克隆出其 *proBA* 基因,发现 *proB* 和 *proA* 是以重叠基因的方式组织的, *proB* 基因

终止密码子(TGA)的前两个碱基 TG 与其上游第 1 个碱基 A 组成了 *proA* 基因的起始密码子,且 *proB* 基因第 781 位由 T 突变为 A^[10]。尽管 *proBA* 基因是以重叠的方式组织的,但仍以分离的方式表达 ProB 和 ProA 两个蛋白。同时发现突变株的 *proBA* 基因在大肠杆菌 JM83 中表达,显著提高了宿主菌耐高渗胁迫能力^[11]。为获得融合的 *proBA* 基因,以研究其表达对宿主菌耐高渗胁迫能力的影响,本研究通过在 *proB* 和 *proA* 基因重叠区添加酶切位点的方法,去掉 *proB* 的终止密码子,将 *proB* 和 *proA* 基因连接起来,表达了一个大的融合蛋白。并分析了融合基因的表达对大肠杆菌(*Escherichia coli*)耐盐能力的影响和胞内游离脯氨酸积累之间的关系,为 *proBA* 融合基因转基因植物研究工作打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 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^[10];大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM83(*proBA*⁻)由德国 Skerra^[12]教授赠送; pBE2 表达载体由武汉大学沈萍教授赠送; pBV220 热诱导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、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。Taq 酶、DNA 回收试剂盒为 MBI 公司产品。

1.1.3 培养基 LB 培养基配制方法参照文献[13]; MM(Minimal Medium)培养基采用 Fiedler^[12]的方法配制。

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-)男,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为嗜极微生物分子生物学。E-mail: lrujie-97@163.com

收稿日期 2004-06-14, 修回日期 2004-09-23

1.2 *proB* 基因终止密码子的去除与基因克隆

在设计引物扩增 *proB* 基因时,在其最后一个氨基酸密码子 AAA 和 *proA* 基因起始密码子 ATG 之间添加一个 *Xba* I 限制性酶切位点,将其终止密码子去掉。上游引物为:5'-GGCCTGCAGACGGAGGAGAACTA-3'(含 *Pst* I 酶切位点),下游引物为:5'-GGCTCTAGATTGTTTTCCCTC-3'(含 *Xba* I 酶切位点)。PCR 反应体系(25 μ L):10 $\times$ buffer 2.5 μ L, MgCl₂2mmol/L, dNTPs 各 0.2mmol/L,上下游引物各 10 μ mol/L, *Taq* 酶 1.3U。以下反应体系各物质的浓度相同。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 3min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物纯化后经 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切,连接到同样双酶切并纯化的 pBE2 载体上,转化大肠杆菌 JM83 (*proBA*⁻),涂布 Amp 抗性的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养。提取重组质粒,经双酶切筛选出阳性转化子。

1.3 *proA* 基因的克隆和含融合基因的重组质粒的构建

扩增 *proA* 基因的上游引物添加了与 *proB* 基因下游引物同样的 *Xba* I 酶切位点。*proA* 基因 PCR 产物经双酶切连接到 *proB* 基因的下游,构建成含融合基因的重组质粒。上游引物为 5'-GGCTCTAGAATGAGTGAAGTATTG-3'(含 *Xba* I 酶切位点),下游引物为 5'-GGCGAGCTCATCGTCAATCTCCCCGCACA-3'(含 *Sac* I 酶切位点)。PCR 反应条件除退火温度为 51 $^{\circ}$ C 外同上。PCR 产物纯化后经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切,连接到同样双酶切的已经插入 *proB* 基因的 pBE2-*proB* 质粒上,转化大肠杆菌 JM83,涂布 Amp 抗性平板 37 $^{\circ}$ C 培养。质粒经双酶切和 DNA 测序确认筛选出含有 *proBA* 融合基因重组质粒的阳性转化子,命名为 JM83(pBE2-*proBA*/MF)。

1.4 *proBA* 融合基因的功能互补鉴定

挑取 JM83(pBE2-*proBA*/MF)单菌落划线接种到 MM 培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养。待菌落长出后,重新划线接种到 MM 培养基上,以进一步鉴定。

1.5 *proBA* 融合基因的克隆和表达产物的 SDS-PAGE 分析

以质粒 pBE2-*proBA*/MF DNA 为 DNA 模板,扩增 *proBA* 融合基因。上游引物为:5'-GGCGGATCCGAACTATGAAAAAG-3'(含 *Bam*H I 酶切位点),下游引物:5'-AGCCTGCAGCTTAAAAAGACTATAC-3'(含 *Pst* I 酶切位点)。PCR 反应条件除退火温度为 53 $^{\circ}$ C 外同 1.4 节。PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切并纯化后,连接到经同样双酶切并纯化的表达载体 pBV220 上,转化大肠杆菌 JM83(*proBA*⁻)。提取质粒,双酶切鉴定出阳性转化子,命名为 JM83(pBV220-*proBA*/MF)。

胞内蛋白质样品制备参照翟超等^[14]的方法。

挑取 JM83(pBV220-*proBA*/MF)和已经构建的含有突变株 *proBA* 基因的转化子 JM83(pBV220-*proBA*/M)^[11]单菌落,接种到含有 Amp 的 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 过夜培养后,按 1% 接种量转接。培养至 OD₅₅₀ 值约 0.4 时,立即转到热诱导温度 42 $^{\circ}$ C,继续培养 4h 后,离心收集菌体,加入 100 μ L 1 $\times$ 上样缓冲液重悬菌体,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min,10000r/min 离心,取上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 JM83 转化子耐高渗透能力的测定

分别挑取 JM83(pBE2-*proBA*/M)和 JM83(pBE2-*proBA*/MF)单菌落,接种到含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 10h,离心收集菌体,用 MM 培养基洗涤两次后,转接到 MM 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期后期,再按适当比例转接到含不同 NaCl 浓度(0.3,0.4,0.5,0.6 mol/L)的 MM 培养基中,使初始 OD₅₅₀ 值约为 0.03,37 $^{\circ}$ C,220r/min 震荡培养。每 2h 测定一次 OD₅₅₀ 值,以培养时间为横坐标,以 OD₅₅₀ 值为纵坐标,绘制生长曲线。转化子的最高耐盐能力定义为:转化子在上述振荡培养时若 48h 内 OD₅₅₀ 值没有变化说明在此盐浓度下不能生长,同其他盐梯度的生长情况对比,我们就可以初步确定最高耐盐能力。

1.7 胞内游离脯氨酸含量的测定

按 Whatmore^[15]的方法测定大肠杆菌 JM83 转化子胞内的游离脯氨酸含量。

2 结果和讨论

2.1 *proBA* 融合基因的构建

在前期的研究工作中,我们发现 *proB* 和 *proA* 首尾重叠。*proB* 基因终止密码子(TGA)的前两个碱基 TG 与其上游第 1 个碱基 A 组成了 *proA* 基因的起始密码子^[10]。尽管 *proBA* 基因以重叠的方式组织,但仍以分离的方式表达 ProB 和 ProA 两个蛋白。其中 *proB* 基因为 1113bp,编码一个由 370 个氨基酸组成的蛋白质分子^[10],*proA* 基因为 1248bp,编码一个由 415 个氨基酸组成的蛋白质^[11]。为获得 *proBA* 融合基因,本研究在设计下游引物扩增 *proB* 基因时,经在其最后一个氨基酸密码子 AAA 末端插入 7 个核苷酸 ATCTAGA,即引入一个限制性酶切位点 *Xba* I,以扩增出没有终止密码子 TGA 的 *proB* 基因。*proA* 基因上游引物同样添加了 *Xba* I 酶切位点。这样 *Xba* I 酶切位点做为一个 Linker(编码丝氨酸和精氨酸)将 *proB* 和 *proA* 基因连接起来置于 pBE2 载体 SP6 启动子的下游。

实验中,以突变株 93151-14 基因组为模板,第一次克隆出 *proR* 基因,将 *proR* 基因连接到 pBE2 表

达载体上。重组质粒(*pBE2-proB*)经 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切,能够切下约 1.1k(*proB* 基因)的片段,说明 *proB* 基因已连接到 *pBE2* 表达载体上。然后将扩增的 *proA* 基因连接到已经含有 *proB* 基因的重组质粒 *pBE2-proB* 上。重组质粒(*pBE2-proBA*)经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切,能切下一条约 1.2k(*proA* 基因)大小的带,同时采用 *Pst* I 和 *Sac* I 双酶切,获得了一条约 2.4 kb 的产物(*proBA* 融合基因),说明 *proBA* 基因已经成功的连接到 *pBE2* 表达载体上。经测序鉴定,表明酶切位点已经如所设计的方式成功地插入,将两个基因连接起来,并且没有突变产生。

2.2 *proBA* 融合基因的功能互补鉴定

利用功能互补的方法来鉴定 *proBA* 融合基因表达产物的活性。将 JM83(*pBE2-proBA/MF*)划线接种到不含脯氨酸的 MM 培养基上,37℃ 培养,经过 12h 就能长出菌落。第二次划线 8h 就能长出菌落。说明融合以后的 *proBA* 基因能够表达有活性的产物,从而催化合成脯氨酸,使 JM83 菌株在基本培养基中获得很好的生长。

2.3 融合基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

为了验证获得的 *proBA* 融合基因是否表达为融合的 ProBA 蛋白,将 *proBA* 融合基因克隆到 *pBV220* 表达载体上,在大肠杆菌 JM83 内进行了表达。表达产物经 SDS-PAGE 分析(图 1)。可见含有非融合基因重组质粒的 JM83(*pBV220-proBA/M*)表达出两种蛋白,分子量分别约为 40kD(ProB)和 45kD(ProA) (图 1,泳道 2,3)。而表达 *proBA* 融合基因的细胞显示有一条约 85kD 的新蛋白带产生(图 1,泳道 1),在 40kD 处的 ProB 蛋白质带消失,但 45kD 处 ProA 的蛋白质带仍旧存在。这说明融合的 *proBA* 基因确实能够表达一个大的融合蛋白。40kD 处的 ProB 蛋白质带消失,是由于 *proB* 基因被去除了终止密码子,不能单独表达,这也验证了我们对 *proB* 基因终止密码子的推测^[10]。而 *proA* 基因之所以仍能表达,是由于其基因和推测的 SD 序列均没有被改变之故。

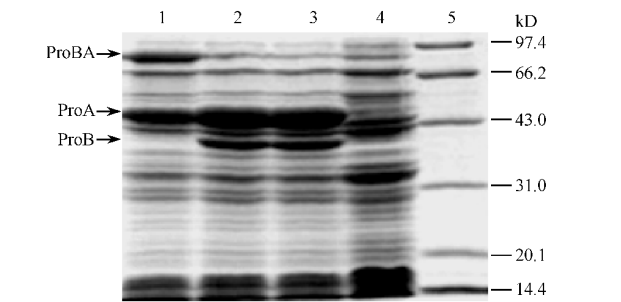


图 1 JM83 (*pBV220-proBA/MF*)表达产物的 SDS-PAGE
Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression products of JM83 (*pBV220-proBA/MF*)
1. JM83 (*pBV220-proBA/MF*); 2 and 3. JM83 (*pBV220-proBA/M*);
4. JM83 (*pBV220*); 5. Protein marker.

2.4 *proBA* 融合基因的表达对大肠杆菌 JM83 耐高渗胁迫能力和胞内游离脯氨酸积累的影响

为了解 *proBA* 融合基因的表达对宿主菌耐高渗胁迫能力的影响,测定 JM83(*pBE2-proBA/MF*)在含不同 NaCl 浓度液体 MM 培养基中的生长(图 2)。

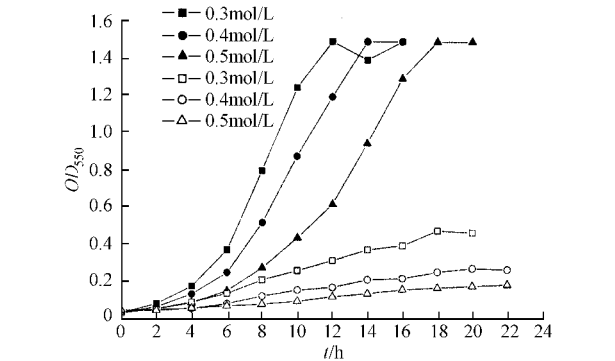


图 2 不同盐浓度下 JM83(*pBE2-proBA/MF*)和 JM83 (*pBE2-proBA/M*)的生长比较
Fig.2 Growth comparison between JM83 (*pBE2-proBA/MF*)and JM83 (*pBE2-proBA/M*) in different NaCl concentrations
The thick symbols are JM83 (*pBE2-proBA/MF*), open symbols are JM83 (*pBE2-proBA/M*).

从图 2 可以看出,随着盐浓度的上升, JM83 (*pBE2-proBA/MF*)和 JM83 (*pBE2-proBA/M*)生长的延迟期和到达稳定期的时间都延长。而在同一盐浓度下, JM83 (*pBE2-proBA/MF*)均比 JM83 (*pBE2-proBA/M*)生长的延迟期和达到稳定期的时间要短,说明其生长更快,代时要短。在进一步的实验中, JM83 (*pBE2-proBA/MF*)最高耐盐能力为 0.6mol/L NaCl,而 JM83 (*pBE2-proBA/M*)最高只能耐 0.5mol/L NaCl。与非融合基因的表达相比,融合基因的表达使宿主细胞的耐盐能力提高了 20%,说明构建的融合基因确实提高了 JM83 宿主细胞的耐高渗胁迫能力。

将 JM83 (*pBE2-proBA/MF*)和 JM83 (*pBE2-proBA/M*)细胞分别接种于含 0.5mol/L NaCl 的 MM 培养基中培养 12h,测定了其胞内的游离脯氨酸含量。 JM83 (*pBE2-proBA/MF*)的胞内游离脯氨酸含量为 200.63μg/g 干细胞,而 JM83 (*pBE2-proBA/M*)仅为 130.03μg/g 干细胞。与表达非融合基因的宿主细胞相比,融合基因的表达使 JM83 宿主细胞胞内游离脯氨酸含量提高了 54.3%。这种胞内游离脯氨酸含量的差异,是 JM83 (*pBE2-proBA/MF*)生长快,能耐更高渗透压胁迫的原因^[16]。

在高渗环境下,枯草芽孢杆菌细胞内合成脯氨酸途径中的第一个中间产物谷氨酰磷酸是很不稳定的,如果 γ-GK 和 γ-GPR 能够相互靠近,以复合体的形式共同起作用,则可以尽快的将谷氨酰磷酸催化进一步合成脯氨酸,提高脯氨酸合成的速率^[8,9]。本研究发现,枯草芽孢杆菌 93151 的 *proBA* 基因尽管

是一个天然的重叠基因,但仍旧表达出两个单独的蛋白质^[11]。本研究成功构建了融合的 *proBA* 基因。这样使表达的融合蛋白 γ -GK/ γ -GPR 相互靠近,更有利于生物体在高渗透胁迫下脯氨酸的快速合成,从而提高了细胞抵御渗透压胁迫的能力。由于在设计中没有改变 *proA* 基因的起始密码子和推测的 SD 序列,所以 *proA* 基因仍旧会单独表达。由于在真核细胞内,翻译过程不需要识别 SD 序列,所以如果在真核细胞内表达 *proBA* 融合基因,则不会表达单独的 ProA 蛋白。因此本研究构建的 *proBA* 融合基因可以用于转基因植物研究,提高植物的耐高渗透胁迫能力。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Brown L M, Hellebust J A. Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Can J Bot*, 1978, **56**: 676–679.
- [3] Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, *et al.* Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1999, **18**: 185–193.
- [4] Hu C A, Delauney A J, Verma D P S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 9354–9358.
- [5] Kishor P B K, Hong Z L, Miao G H, *et al.* Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1995, **108**: 1387–1394.
- [6] Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, *et al.* Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 1995, **7**: 751–760.
- [7] Deutch 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**: 6337–6355.
- [8] Sleanor R D, Gahan C M, Hill C. 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**: 2571–2577.
- [9] Meijer P J, Lilius G, Holmberg N, *et al.* An artificial bifunctional enzyme, γ -glutamyl kinase/ γ -glutamyl phosphate reductase, improves NaCl tolerance when expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 1996, **18**: 1133–1138.
- [10] 苗丽霞,曹军卫,刘瑞杰,等. 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**: 1111–1117.
- [11] 刘瑞杰,曹军卫,苗丽霞. 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. 微生物学报, 2004, **44**(4): 452–456.
- [12] 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.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Smith L T. Characterization of a γ -glutamyl kinase from *Escherichia coli* that confers proline overproduction and osmotic tolerance. *J Bacteriol*, 1985, **164**: 1088–1093.

Construction of fused osmoregulation *proBA* gene from a salt-tolerant mutant of *Bacillus subtilis* and its influence on the osmotolerance of *Escherichia coli*

LIU Rui-jie CHEN Ting CAO Jun-wei*

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

Abstract: The osmoregulation *proB* and *proA* genes from *Bacillus subtilis* 93151 are overlapping genes, which encode two proteins ProB and ProA. A restriction enzyme site was inserted in the overlapping region of *proB* and *proA* genes from a salt-tolerant mutant of *B. subtilis* 93151, and a fusion gene was constructed by cloning *proB* and *proA* genes respectively. SDS-PAGE analysis showed that a novel protein with molecular mass of 85 kD was observed. When expressed in *E. coli*, enhanced intracellular concentrations of free proline and osmotolerance of the strain carrying the fusion gene were observed, compared with the control host cell harbouring a plasmid encoding the separate ProB and ProA.

Key words: *Bacillus subtilis*, Proline, Fusion gene, Osmotolerance