

短短小芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭分泌表达载体的构建

彭清忠 张惟材 朱厚础*

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 应用 PCR 技术从具有分泌蛋白能力强且没有胞外蛋白酶活性的短短小芽孢杆菌 50 中分离出细胞壁蛋白基因的多启动子和信号肽编码序列,利用它与质粒 pUB110 和 pKF3 一起构建成穿梭分泌表达载体 pBKE50。将 α -淀粉酶基因引入该载体转化短短小芽孢杆菌 50 后,发现 α -淀粉酶可以活性形式分泌表达。此工作为下一步建立短短小芽孢杆菌高效分泌表达系统奠定了基础。

关键词 短短小芽孢杆菌,穿梭载体,分泌表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0438-04

分泌表达作为蛋白质的一种表达形式具有以下优势:1. 产物一般可溶、可正确折叠、有生物活性;2. 表达产物与胞内蛋白分离,毋需破碎细胞,利于分离纯化,简化工艺。现有原核分泌表达系统不尽如人意。大肠杆菌在进行外源蛋白高效表达时易形成包涵体;产物分泌表达水平低,且常分泌至周质空间而非胞外^[1]。枯草芽孢杆菌具有良好的分泌性和非致病性,但胞外蛋白酶活性高,易引起产物降解^[2]。短短小芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*, *Br. brevis*)具有分泌蛋白能力强和胞外蛋白酶活性低的特点^[3],是分泌表达外源蛋白较理想的宿主。

分泌蛋白能力强的短短小芽孢杆菌分泌至培养基中的蛋白质主要是一或二种高分子量的细胞壁蛋白。其细胞壁蛋白基因的转录由 5 个串联启动子控制,转录功能强,且在细胞壁蛋白表达过程中起主要作用的 P₂ 和 P₃ 启动子受时序调节^[3,4]。细胞壁蛋白的信号肽序列具有一般革兰氏阳性菌信号肽序列的典型特征,能有效地介导细胞壁蛋白的分泌。故此类启动子和信号肽编码序列应是驱动外源基因在短短小芽孢杆菌中分泌表达的较理想元件。本文从筛选的具有高蛋白分泌能力且没有胞外蛋白酶活性的短短小芽孢杆菌 50 中分离出细胞壁蛋白基因多启动子和信号肽编码序列,与芽孢杆菌克隆质粒

pUB110 和大肠杆菌质粒 pKF3 一起构建了一个穿梭分泌表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养条件 短短小芽孢杆菌 50 系从土壤中分离得到,并经生理生化、细菌脂肪酸组成和 16S rRNA 序列分析初步鉴定^[5]。大肠杆菌 JM109 为本室收藏。枯草芽孢杆菌 168 和质粒 pUB110 由芬兰国家公共卫生研究所 Vesa Kontinen 博士惠赠,质粒 pGK13 由德国 Friedrich Schiller 大学 Jorg Müller 博士惠赠,质粒 pKF3 购自 TaKaRa 公司,质粒 pGEM-T 购自 Promega 公司。

短短小芽孢杆菌培养用 T₂ 培养基^[4],大肠杆菌培养用 LB 培养基。

1.1.2 酶和试剂 :DNA 聚合酶 I(Klenow Fragment), T4 DNA 连接酶和内切酶等工具酶及分子量标准购自 TaKaRa 公司。PCR 反应试剂购自上海生工公司,抗生素购自华美公司。

1.2 方法

1.2.1 短短小芽孢杆菌细胞壁蛋白基因多启动子和信号肽编码序列的分离及分析 :用 CLUSTAL W (1.8) 软件对短短小芽孢杆菌 BB47 和 HPD31 细胞

收稿日期 2002-01-25,修回日期 2002-04-16。

基金项目 军事医学科学院创新课题启动基金资助课题(No.0010018)。

* 通讯作者。Tel:86-10-66948856; Fax:86-10-63895646; E-mail: zhuhouchu@sina.com

壁蛋白基因启动子和信号肽编码序列进行同源性比较,根据保守序列设计一对 PCR 引物:5' CCCAAGCTTCGTGAGAATGCGTACCAAA 3'和 5' TC-CCCCGGGCTGCAG CGAAAGCCATGGGAGCAAC 3',其中上游引物引入 *Hind* III 酶切位点,下游引物引入 *Sma* I 和 *Pst* I 酶切位点。用全菌 PCR 方法从所筛的短短小芽孢杆菌 50 中钓取启动子和信号肽编码序列。反应参数:94℃ 5min,94℃ 40s→60℃ 30s→72℃ 50s,30 个循环,72℃ 5min,4℃ 保存。纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接、转化 JM109 后用 Sanger 双脱氧链终止法测序。将所测序列与短短小芽孢杆菌 BB47 和 HPD31 的细胞壁蛋白基因启动子和信号肽编码序列进行同源性比较,分析序列的酶切位点及细胞壁蛋白的表达和分泌元件。

1.2.2 腺嘌呤甲基化酶基因(红霉素抗性基因)的克隆及测序 根据腺嘌呤甲基化酶基因设计 PCR 引物:5' GAAGATCTCAGCTCCAGATCGATTCACA 3'和 5' CCGGACCAACACACTAGACTTATTACTTCG 3',其中上游引物引入 *Bgl* II 酶切位点,下游引物引入 *Ava* II 酶切位点。以 pGK13 质粒为模板利用 PCR 技术分离腺嘌呤甲基化酶基因。反应参数:94℃ 5min,94℃ 50s→58℃ 40s→72℃ 1.2min,30 个循环,72℃ 延伸 5min,4℃ 保存。扩增产物连接于 pGEM-T 后用 Sanger 双脱氧链终止法测序。

1.2.3 穿梭分泌表达载体 pBKE50 的构建及转化: 以 pUB110 和 pKF3 构建穿梭分泌表达载体 pBKE50,详细过程见结果。短短小芽孢杆菌转化采用电穿孔转化法^[4],电穿孔仪为 BioRad 公司 Gene Pulser,脉冲参数为 0.75kV/mm,25 μ F 和 500 Ω 。

1.2.4 α -淀粉酶活性检测及活力测定 将鉴定正确的重组菌接种至含 0.5% 可溶性淀粉的 T₂ 琼脂平板(含红霉素 10 μ g/mL)中,于 30℃ 培养箱培养。第 2 天用碘液(0.2% I₂ + 2% KI)覆盖平板观察菌落周围透明圈产生情况。 α -淀粉酶活力测定按文献^[6]进行。

2 结 果

2.1 短短小芽孢杆菌细胞壁蛋白基因启动子和信号肽编码序列的分离及分析

对分泌蛋白能力强的短短小芽孢杆菌 BB47 和 HPD31 的细胞壁蛋白基因启动子和信号肽编码序列进行比较,发现它们之间有 84% 的同源性。其中两者的信号肽序列完全相同^[7]。于是,我们将下游引物设在信号肽编码序列末端,上游引物选在离信号肽编码序列末端约 600bp 的保守区域。用此引物对

从土壤中分离到的分泌蛋白能力强且没有胞外蛋白酶活性的短短小芽孢杆菌 50 号菌进行 PCR 扩增,获得约 600bp 的特异片段(图 1)。扩增产物经测序后送 GenBank 注册(Accession No. AF424045)。

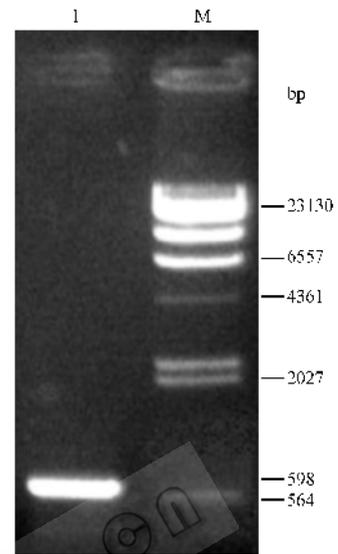


图 1 短短小芽孢杆菌细胞壁蛋白基因启动子和信号肽编码序列的扩增

Fig.1 Analysis of PCR product by agarose gel electrophoresis

M. λ DNA/*Hind*III marker ;1. The 5' region of the cell wall protein gene containing multiple promoters and the signal peptide-coding sequence of *Br. brevis*50

将所得序列与短短小芽孢杆菌 BB47 和 HPD31 的细胞壁蛋白基因启动子和信号肽编码序列进行多重比较,发现与短短小芽孢杆菌 BB47 的同源性均为 95%,与 HPD31 的同源性为 88%。对其进行酶切分析,发现在启动子区域有 *Eco*R I 和 *Spe* I 2 个常见酶切位点,在信号肽编码序列中有 3 个酶切位点 *Hpa* I、*Apa* I 和 *Nco* I,此 3 个酶切位点可作为表达载体中外源基因的插入位点。同源性分析表明该序列的转录、翻译元件与短短小芽孢杆菌 BB47 的基本一致:有 5 个串联的启动子 P₁、P₂、P₃、P₄ 和 P₅。在串联启动子的下游,有两个翻译起始位点^[7]。第一个翻译起始位点包括 SD₁ 和起始密码 TTG(在芽孢杆菌中用作起始密码^[8]),第二个翻译起始位点包括 SD₂ 和 ATG。从第二个起始位点翻译的细胞壁蛋白带有 23 个氨基酸的典型信号肽序列,比一般的革兰氏阳性菌信号肽序列短(约 30 个氨基酸),而从第一个位点进行翻译时,在典型信号肽序列前另有 31 个带丰富电荷的氨基酸(7 个带正电荷的残基 4

个带负电荷的残基)^[7]。

2.2 腺嘌呤甲基化酶基因(红霉素抗性基因)的分离

利用腺嘌呤甲基化酶基因序列引物,从 pGK13 质粒中扩增出红霉素抗性基因(图 2)。PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体后测序,结果与文献[9]完全一致。

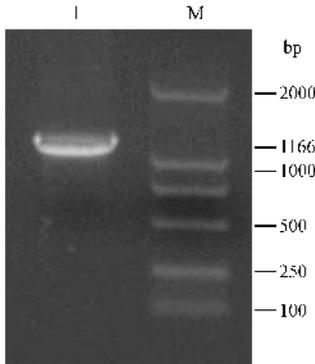


图 2 腺嘌呤甲基化酶基因的扩增

Fig. 2 Analysis of PCR product by agarose gel electrophoresis

M. DL2000 marker; 1. Adenine methylase gene

2.3 穿梭分泌表达载体 pBKE50 的构建

2.3.1 质粒 pKF34 的构建 将质粒 pKF3 和 pUB110 分别用 *Pvu* II 和 *Eco* RI 进行双酶切,回收大片段。再连接、转化大肠杆菌获得质粒 pKF32(图 3)。用 *Spe* I 和 *Pvu* II 消化 pKF32,补平 *Spe* I 酶切后的粘性末端(*Pvu* II 酶切后为平端),再重新环化,获质粒 pKF33(图 3)。此过程不仅去除了质粒 pKF3 上的表达元件(启动子、RBS 和 ATG),同时也去除了 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点。分别用 *Ava* II 和 *Bgl* II 酶切 pKF33 质粒,去除新霉素抗性基因(*Neo*),然后将用同样内切酶消化过的红霉素抗性基因与之连接,构建成 pKF34 质粒(图 3)。

2.3.2 质粒 pBKE50 的构建 首先用 *Hind* III 和 *Sma* I 双酶切短短小芽孢杆菌 50 的 PCR 产物,然后将其引入用上述两酶消化过的 pKF34 质粒中,即构建成穿梭分泌表达载体 pBKE50(图 3)。

2.4 枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因在短短小芽孢杆菌中的分泌表达

为检测新构建载体的功能,应用 PCR 技术从枯草芽孢杆菌 168 中分离出 α -淀粉酶结构基因,用 *Nco* I 和 *Kpn* I 双酶切后,将其引入穿梭分泌表达载体 pBKE50 中构建成重组质粒 pBKE50/ α -amy^[10]。利用电穿孔法将该重组质粒转入短短小芽孢杆菌 50 中,发现 α -淀粉酶以活性形式被分泌表达。分泌的 α -淀粉酶降解重组菌周围的淀粉(T_2 琼脂平板含 0.5% 可溶性淀粉),碘液的加入使得菌落周围出现无色透明圈(图 4)。以 α -淀粉酶基因片段的供体菌

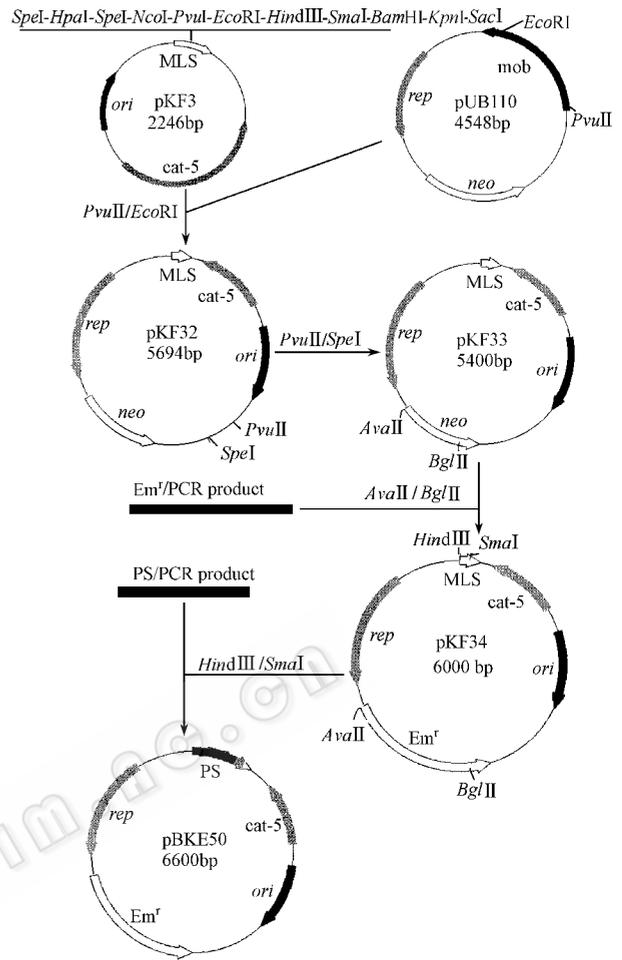


图 3 穿梭质粒 pBKE50 的构建

Fig. 3 Construction of shuttle expression vector pBKE50

PS. The 5' region of the cell wall protein gene containing multiple promoters and the signal peptide-coding sequence of *Br. brevis* 50; cat-5. Chloramphenicol-resistance gene; Em^r. Erythromycin-resistance gene; ori. The replication origin of *E. coli*; rep. The replication origin of *Br. brevis*

枯草芽孢杆菌 168 为对照,与短短小芽孢杆菌 50 (*pBKE50*/ α -amy)同时进行试管培养,然后测定(-淀粉酶活力^[6])。发现重组菌株的 α -淀粉酶活力约为出发菌株的 2 倍。

3 讨论

建立新的分泌表达系统是目前基因工程研究领域的热点工作之一。短短小芽孢杆菌的蛋白分泌能力强,胞外蛋白酶活性低,在其培养上清中还发现有二硫键氧化还原酶(Dsb)和肽基脯氨酸顺反异构酶(PPIase),这些酶能促进多肽的正确折叠,形成有生物活性的天然蛋白^[4]。故利用这类短短小芽孢杆菌可望建立起一套很有前景的新的原核分泌表达系统。我们从土壤中分离到了 5 株分泌蛋白能力强且

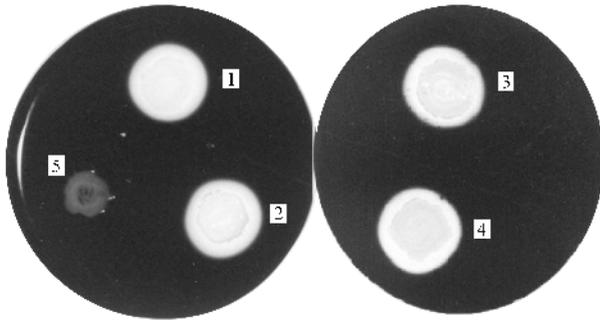


图4 重组短短小芽孢杆菌胞外 α -淀粉酶活性检测

Fig.4 Assay of extracellular α -amylase activity in *Br. brevis* 50 (pBKE50/ α -AMY)

T_2 agar medium containing 0.5% starch was used for α -amylase assay. After cultivation of the bacteria, the plates were flooded with iodine solution (0.2% I_2 and 2% KI). Colorless halo against a blue background indicated that bacteria excreted α -amylase. 1 ~ 4. *Br. brevis* 50 (pBKE50/ α -AMY) 5. *Br. brevis* 50 (pBKE50)

没有胞外蛋白酶活性的短短小芽孢杆菌株。本文选其中的一株——50号菌为宿主,构建用于外源蛋白分泌表达的穿梭载体。在此过程中,利用 pUB110 质粒提供短短小芽孢杆菌的复制起始区,因为该质粒在芽孢杆菌中以高的拷贝数形式复制,常用于外源基因的克隆和表达^[1]。虽然新霉素抗性基因是芽孢杆菌中较好的抗性选择标记之一,但由于我们筛选的宿主菌抗新霉素,因此选用红霉素抗性基因取代 pUB110 质粒上的新霉素抗性基因作为选择标记。由于在短短小芽孢杆菌中进行遗传操作比较困难,故在构建的载体中引入大肠杆菌质粒 pKF3,以便使外源基因的克隆和序列分析等初始工作在大肠杆菌中进行,比较方便。当我们将枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因引入穿梭表达载体 pBKE50 后,发现 α -淀粉酶以活性形式被分泌表达。该结果表明我们初

步建立了短短小芽孢杆菌分泌表达系统。这一系统的成功建立不仅丰富了供选的外源蛋白表达系统,而且为分泌表达的基础研究和表达系统的进一步改良奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**: 411 ~ 421
- [2] Sarvas M. Gene expression in recombinant *Bacillus*. *Bioprocess Technol*, 1995, **22**: 53 ~ 120
- [3] Udaka S, Tsukagoshi N, Yamagata H. *Bacillus brevis*, a host bacterium for efficient extracellular production of useful proteins. *Biotech Genet Eng Rev*, 1989, **7**: 113 ~ 146
- [4] Udaka S, Yamagata H. Protein secretion in *Bacillus brevis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, **64**: 137 ~ 143
- [5] PENG Q (彭清忠), ZHANG W (张惟材), ZHU H (朱厚础). Screening and identification of protein-hyperproducing *Brevibacillus brevis*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2002 (in press)
- [6] ZHOU D (周德庆). *Experimental handbook of Microbiology* (微生物学实验手册), Shanghai Science Technology Press, 1986
- [7] PENG Q (彭清忠), ZHANG W (张惟材), ZHU H (朱厚础). Isolation of the 5' region of cell wall protein gene containing multiple promoters and the signal peptide-coding sequence in protein-producing *Brevibacillus brevis*. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 2002, **1**: 23 ~ 25
- [8] Adachi T, Yamagata H, Tsukagoshi N *et al.* Use of both translation initiation sites of the middle wall protein gene in *Bacillus brevis* 47. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 511 ~ 513
- [9] Sueharu H, Bernard W. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J Bacteriol*, 1982, **150**, 804 ~ 814
- [10] PENG Q (彭清忠), ZHANG W (张惟材), ZHU H (朱厚础). Secretory expression of α -amylase in *Brevibacillus brevis*. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 2002, **3**: 167 ~ 169
- [11] Mckenzie T, Hoshino T, Tanaka T *et al.* The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid*, 1986, **15**: 93 ~ 103

The Construction of Shuttle Vectors of *Brevibacillus brevis*-*Escherichia coli*

PENG Qing-Zhong ZHANG Wei-Cai ZHU Hou-Chu*

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract The 5' region of the cell wall protein (CWP) gene containing multiple tandem promoters and the signal peptide-coding sequence was isolated by PCR from *Br. brevis* 50, and used to construct the shuttle vector pBKE50, which included the replication origin of pUB110 and the erythromycin-resistance gene of pGK12. The α -amylase gene of *Bacillus subtilis* 168 was ligated to pBKE50, producing plasmid pBKE50/ α -amy. After the resulting plasmid was introduced into *Br. brevis* 50, soluble and biologically active α -amylase was secreted directly into the culture medium. The expression level of α -amylase in the recombinant *Br. brevis* 50 was twice higher than that of the donor strain.

Key words *Brevibacillus brevis*, shuttle vector, secretory expression

Received: 01-25-2002

This work was supported by Science Exploration Foundation of Academy of Military Medical Sciences (No. 0010018).

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

* Corresponding author. Tel 86-10-66948856; Fax 86-10-63895646; E-mail zhuhouchu@sina.com