

双启动子对重组溶源性枯草杆菌中外源蛋白表达的增强作用 Dual Promoters Enhance Heterologous Enzyme Production from Bacterial Phage Based Recombinant *Bacillus subtilis*

刘 刚* 张 燕 邢 苗

LIU Gang* , ZHANG Yan and XING Miao

深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳大学生命科学学院 深圳 518060

Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering , College of Life Sciences , Shenzhen University , Shenzhen 518060 , China

摘 要 探讨了双启动子对基于溶源性噬菌体构建的重组枯草杆菌中外源蛋白表达的影响。分别将不含或含有本身启动子的 α -淀粉酶基因(来源于 *Bacillus amyloliquefaciens*) 和青霉素酰化酶基因(来源于 *Bacillus megaterium*) 克隆到溶源性枯草杆菌中,得到重组菌 *B. subtilis* AMY1, *B. subtilis* AMY2, *B. subtilis* PA1 以及 *B. subtilis* PA2。由于同源重组,所克隆的片段整合到溶源性枯草杆菌中的噬菌体基因组上,并处于噬菌体强启动子的下游。在重组菌 AMY1 和 PA1 中,在热诱导的情况下外源基因的转录只受到噬菌体启动子的作用,而在重组菌 AMY2 和 PA2 中,在热诱导下外源基因的转录同时受到噬菌体启动子和基因本身所带启动子的作用。双启动子的应用使重组 α -淀粉酶的表达量提高了 133%,使重组青霉素酰化酶的表达量提高了 113%。

关键词 α -淀粉酶 解淀粉芽孢杆菌 巨大芽孢杆菌 枯草芽孢杆菌 双启动子 青霉素酰化酶

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0191-07

Abstract The effect of dual promoters on recombinant protein production from bacterial phage based *Bacillus subtilis* expression system was investigated. Alpha amylase (from *Bacillus amyloliquefaciens*) and penicillin acylase (from *Bacillus megaterium*) were selected as the indicating enzymes. Both the promoterless genes and the promoter-bearing genes were isolated through PCR amplification with properly designed primers, and were inserted into plasmid pSG703 that contains the *lacZ-cat* expression cartridge. The lysogenic *B. subtilis* ($\phi 105$ MU331) was transformed with the resultant recombinant plasmids, and the heterologous genes were thereby integrated into the chromosomal DNA of *B. subtilis* via homologous recombination. The transformants were designated as *B. subtilis* AMY1, *B. subtilis* AMY2, *B. subtilis* PA1, and *B. subtilis* PA2, respectively. In the recombinant *B. subtilis* strains, the inserted sequences were located down stream of a strong phage promoter that could be activated by thermal induction. In *B. subtilis* AMY1 and *B. subtilis* PA1, transcription of the heterologous genes was only initiated by the phage promoter after heat shock, whereas in *B. subtilis* AMY2 and *B. subtilis* PA2, transcription of the heterologous genes was initiated by dual promoters, the phage promoter and the native promoter. The application of dual promoters increased the productivity of both enzymes, with 133% enhancement for α -amylase production and 113% enhancement for penicillin acylase production.

Key words α -amylase, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis*, dual promoters, penicillin acylase

启动子对于重组蛋白的表达非常重要。使重组蛋白被高效表达的启动子通常具有下列两个特点:

1) 足够强,能够有效地启动外源基因的转录; 2) 在不需要表达时受严紧的调控,而在需要表达时可以用

简单而廉价的方法进行诱导。有很多这样的启动子已被开发并应用于外源蛋白的表达,如 *E. coli* 中的 P_{lac} 、 P_{trp} 、 P_{tac} 和 P_{T7} 启动子^[1,2] 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中的 P_{43} 和 P_{amy} 启动子等^[3,4]。尽管有很多证据表明自然界中存在双启动子作用于同一基因的情况,但较少有人将其应用于外源基因的表达。

用来进行外源基因表达的启动子都是根据生物体中存在的启动子开发出来的。天然的启动子种类繁多,而且各具特点。有些启动单基因的转录,而另外一些与多个基因的转录有关;有些单独启动基因的转录,但也有两个或多个启动子共同启动一个或多个基因的转录。在大肠杆菌中,硝酸盐还原酶操纵子的转录由两个互相重叠的启动子启动^[5],半乳糖操纵子的转录也受到两个对细胞内 cAMP 浓度反应不同的启动子的共同作用,其中一个被胞内 cAMP 激活,而另一个被胞内 cAMP 抑制^[6]。枯草芽孢杆菌中细胞色素操纵子的转录受两个启动子的启动^[7],而短小芽孢杆菌细胞壁上的两种蛋白的转录也与多个启动子有关^[8]。在真核生物中,也有多个启动子共同启动基因转录的例子,如人的 CD94 基因^[9],人的 CD1D 基因^[10],鼠的 RNase4 和 RNase5 位点等^[11]。

本文报道了基于溶源性噬菌体构建的枯草杆菌表达系统中双启动子对青霉素酰化酶 (penicillin G acylase, PGA) 和 α -淀粉酶 (α -amylase, AMY) 表达的促进作用。在该系统中,溶源性枯草杆菌的噬菌体 $\phi 105\text{MU}331$ 上有一个位于强启动子下游的 '*lacZ-cat*' 表达盒^[13]。另外,在噬菌体 $\phi 105\text{MU}331$ 的免疫抑制区还存在一个 *cts-52* 突变,使得噬菌体的强启动子能受热诱导而被激活,从而可以使插入的外源基因得到表达。通过同源重组分别将含有和不含本身启动子序列的基因整合到溶源性枯草杆菌的染色体上。当插入的为不含本身启动子的基因时,在热诱导的情况下外源基因只由噬菌体的启动子转录;当插入的为含有本身启动子的基因时,诱导后外源基因由其本身启动子和噬菌体启动子共同进行转录。与单启动子的情况相比,双启动子显著地增强了外源基因的表达效率。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体

E. coli DH5 α 用于质粒的维护和操作。解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23843) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus magaterium* ATCC 14945) 购

自 ATCC, 分别用于分离 α -淀粉酶 (*amy*) 的基因和青霉素酰化酶 (*pac*) 的基因。*B. subtilis* ($\phi 105\text{MU}331$) 是含有重组原噬菌体 $\phi 105\text{MU}331$ 的溶源菌。原噬菌体 $\phi 105\text{MU}331$ 是 $\phi 105$ 的一个衍生噬菌体,含有一个 *lacZ'-ermC-cat* 表达盒。质粒 pSG703 含有 '*lacZ-cat*' 表达盒,用于基因的克隆和与原噬菌体进行同源整合^[12]。

1.2 培养基与微生物的培养

营养琼脂 (beef extract 1g/L, peptone 10g/L, NaCl 5g/L, agar 20g/L) 用于芽孢杆菌和 *E. coli* 的平板和斜面培养,当用于筛选重组菌株时分别加入 80mg/L 的氨苄青霉素或 5mg/L 的氯霉素。BHY 培养基 (bovine brain heart infusion 37g/L, yeast extract 5g/L) 用于芽孢杆菌的液体培养,而 *E. coli* 的液体培养采用 LB 培养基 (tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L)。用于重组 α -淀粉酶表达的培养基含葡萄糖 5g/L, 胰蛋白胨 10g/L, 酵母抽提物 3g/L, 柠檬酸 1g/L, KH_2PO_4 1.5g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/L。用于重组 PGA 表达的培养基为 BHY 培养基。所有菌株的培养温度均为 37 $^{\circ}\text{C}$, 进行摇瓶培养的旋转摇床转速为 250r/min。在进行重组蛋白的表达时,将处于对数生长后期的培养液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 3min 进行热诱导。

1.3 DNA 操作

芽孢杆菌基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法,*E. coli* 中质粒的提取采用碱裂解法^[13]。DNA 的限制性内切酶酶切、连接以及 PCR 扩增反应按标准的方法进行^[13]。限制性内切酶、连接酶以及 DNA 聚合酶等为 TaKaRa (大连) 或上海生工的产品,引物的合成由 TaKaRa 完成。用于扩增不含启动子的 α -淀粉酶基因 (*amy*) 的引物为: 5'-GCA GAG CTC GCC CCG CAC ATA CGG AAA GA -3' (正向引物) 和 5'-GCT TCT AGA TAA ACG CAC CTC CAA GCT GA -3' (反向引物)。用于扩增含本身启动子的 α -淀粉酶基因 (*amyPB*) 的引物为: 5'-AGT GAG CTC AAA ATG AGA GGG AGA GGA AAC AT-3' (正向引物) 和 5'-GCT TCT AGA TAA ACG CAC CTC CAA GCT GA -3' (反向引物)。在引物中均加入了 *Sac* I 和 *Xba* I 的酶切位点 (斜体)。扩增不含启动子的青霉素酰化酶基因 (*pac*) 和含本身启动子的青霉素酰化酶基因 (*pacPB*) 所使用的正向引物分别为: 5'-GCA GAG CTC ACG GTA AGG TTA TGA TTC GTG A-3' 和 5'-AGT CGT TCC TTC TTT AAT AAT A-3', 反向引物是相同的, 为 5'-GCT TCT AGA ATC GAG CTC ACA GCA TCA

AT-3'。在引物中也加入了 *Sac* I 和 *Xba* I 的酶切位点(斜体)。PCR 扩增产物用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切后与 pSG703 连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 后在含 80mg/L 氨基青霉素的营养琼脂平板上筛选转化子。从转化子中提取重组质粒后按另文所述的方法转化 *B. subtilis* (ϕ 105MU331)^[12]。DNA 的序列测定由 TaKaRa 公司(大连)完成。

1.4 SDS-PAGE 和琼脂糖凝胶电泳

蛋白质的 SDS-PAGE 分析和核酸的琼脂糖凝胶电泳按 Sambrook 等的方法进行^[13]。在 SDS-PAGE 分析中,凝胶浓度为 12.5%, 进样量为 5 μ L。

1.5 分析方法

根据水解淀粉的能力来确定 α -淀粉酶的活性,具体的方法如 Park 等所述^[14]。反应混合液含 50 μ L 酶液(适当稀释后的培养上清液),50 μ L 0.5mol/L pH9.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液和 100 μ L 0.2%的可溶性淀粉溶液。反应体系在 50 $^{\circ}$ C 下保温 10min 后,加入 200 μ L 1.5mol/L 的乙酸终止反应。最后加入 200 μ L 碘试剂(含 0.2% I₂ 和 2% KI)进行显色并测定 690nm 下的吸光值。将在上述条件下 10min 内使 690nm 的吸光值下降 2.5% 所需要的酶量定义为一个活力单位。PGA 的活性大体按 Chow 等的方法以 3-苯乙酰胺基-6-硝基苯甲酸(NIPAB)为底物进行测定^[15]。反应体系含 0.6mmol/L NIPAB 和适量的酶。加入酶以后,迅速地记录 405nm 下吸光值的增加量,并根据 3-氨基-6-硝基苯甲酸的消光系数计算产物的生成量。将上述条件下每 min 生成 1 μ mol 3-氨基-6-硝基苯甲酸所需要的酶量定义为一个活力单位。通过测定 600nm 下的吸光值进行细胞密度的分析。根据标准曲线进行计算的结果,1OD 相当于 0.41 gDCW/L。葡萄糖浓度的测定采用 DNS 法。

2 结果

2.1 重组菌株的构建

应用 PCR 方法成功分离了不含启动子的 *amy* 基因和 *pac* 基因(分别为 1618bp 和 2538bp)含本身启动子的 *amy* 基因(*amyPB*, 1850bp)和 *pac* 基因(*pacPB*, 2780bp)。并对上述片段进行了序列分析,结果表明所获得的基因序列与 GenBank 发布的序列一致。

PCR 扩增产物经 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切后与同样酶切的质粒 pSG703 连接,分别得到含 *amy*、*amyPB*、*pac* 和 *pacPB* 的重组质粒 pSGA1、pSGA2、pSGP1 和 pSGP2。重组质粒采用双酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴

定,结果如图 1 所示。分别将上述重组质粒用 *Sac* II

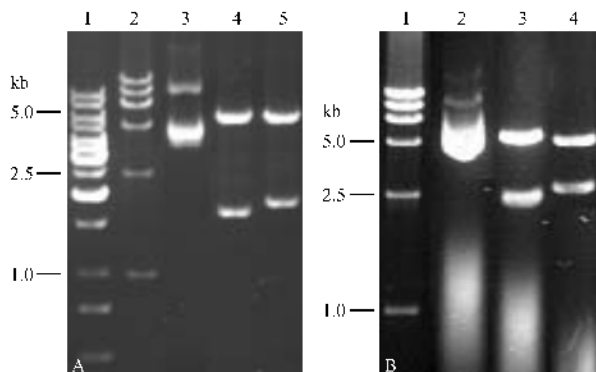


图 1 重组质粒的电泳分析结果

Fig. 1 Agarose gel analysis of the recombinant plasmids A: plasmids pSGA1 and pSGA2. 1 and 2: nucleic acid molecular markers; 3: plasmid pSG703; 4: *Sac* I and *Xba* I double digested pSGA1; 5: *Sac* I and *Xba* I double digested pSGA2. B: plasmids pSGP1 and pSGP2. 1: nucleic acid molecular markers; 2: plasmid pSG703; 3: *Sac* I and *Xba* I double digested pSGP1; 4: *Sac* I and *Xba* I double digested pSGP2.

线性化后转化处于稳定期初期的 *B. subtilis* (ϕ 105MU331),此时的 *B. subtilis* 为高感受态细胞^[12]。因为质粒和原噬菌体 ϕ 105MU331 之间具有同源的序列(*lacZ* 和 *cat* 片段),目的基因可以通过同源重组整合到溶源性枯草杆菌的染色体上(图 2)。采用氯霉素抗性平板和红霉素抗性平板按 Cm^R 和 Er^S 表型筛选转化子。经过产酶筛选,将分别转化了不同基因片段 *amy*、*amyPB*、*pac* 和 *pacPB* 的转化子命名为 *B. subtilis* AMY1、*B. subtilis* AMY2、*B. subtilis* PA1、和 *B. subtilis* PA2。采用 PCR 方法和 DNA 的序列测定对转化子进行了鉴定,同时用 *B. subtilis* (ϕ 105MU331)作为对照。使用的 PCR 引物为 P1: 5'-TCC ATG TTG CCA CTC GCT TTA-3' (正向引物,含 *lacZ* 编码序列中 677-697 bp 的序列)和 P2: 5'-ACC TGT TGA AGA AGC GGG G-3' (反向引物,含 *cat* 编码序列中 588-606 bp 的序列)。以 *B. subtilis* (ϕ 105MU331)的基因组 DNA(含红霉素的抗性基因)为模板进行 PCR 扩增得到了 1200 bp 的片段(含 *lacZ* 中的 267bp, *cat* 中的 30bp, *ermC* 中的 734bp 以及 179bp 的连接片段)。采用上述引物分别以 *B. subtilis* AMY1、*B. subtilis* AMY2、*B. subtilis* PA1 和 *B. subtilis* PA2 的基因组 DNA 为模板扩增得到了大小分别为 2237 bp、2548 bp、3157 bp 和 3399 bp 的片段如图 3 所示。所扩增片段的大小与预期相符,而且对 PCR 产物的序列测定结果表明目的片段都正确地插入到 *B. subtilis* (ϕ 105MU331)的染色体上。

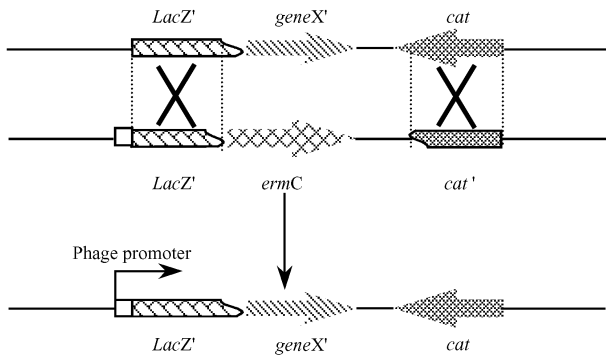


图2 外源基因经双交换同源重组整合到重组菌株染色体上的示意图

Fig. 2 The schematic representation of the double crossover recombination event between derivatives of plasmid pSG703 and prophage ϕ 105MU331, through which the objective gene "geneX" was inserted into the lysogenic *B. subtilis* (ϕ 105MU331). The double crossover recombination event results in the substitution of the *lacZ'-ermC-cat'* cartridge by the *lacZ'-geneX-cat* cartridge in the plasmid.

2.2 双启动子对重组 α -淀粉酶表达的影响

培养菌株 *B. subtilis* AMY1 合成重组 α -淀粉酶的过程示于图4A。热诱导后噬菌体的强启动子被激活,并使培养上清液中 α -淀粉酶的活性迅速积累,诱导后8 h内 α -淀粉酶的活性可达到112.6ku/mL。因为在该菌株中所含有的是不含启动子的 α -淀粉酶的基因,其转录只受噬菌体强启动子的启动。当不进行热诱导时只能合成少量的 α -淀粉酶(3.98 ku/mL),对照实验表明这部分淀粉酶是由宿主自身合成的。

与 *B. subtilis* AMY1 相反,*B. subtilis* AMY2 在没有热诱导的情况下也可以合成大量的 α -淀粉酶(图4B)。其原因在于 *B. subtilis* AMY2 中的重组 α -

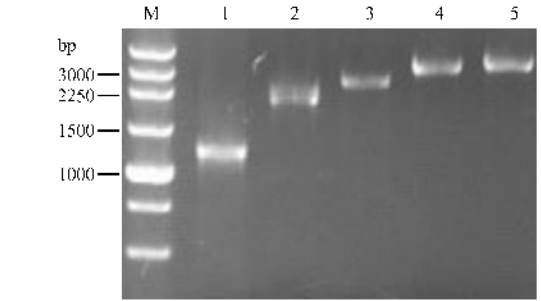
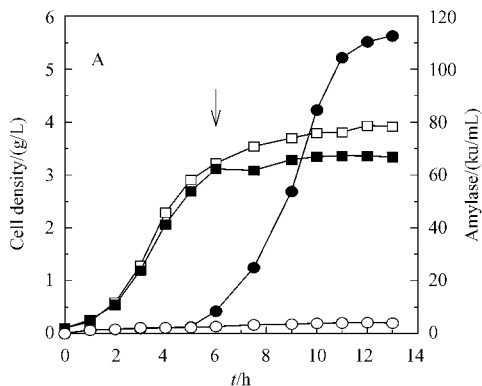


图3 重组菌株的PCR鉴定

Fig. 3 PCR amplification of the inserted fragments from the genomic DNA of the recombinant strains. The primers were designed according to the flanking *lacZ* and *cat* sequences

M: DNA marker; 1: *B. subtilis* (ϕ 105MU331); 2: *B. subtilis* AMY1; 3: *B. subtilis* AMY2; 4: *B. subtilis* PA1; 5: *B. subtilis* PA2.

淀粉酶的基因含有其本身的启动子,该启动子能够在对数生长末期被自动激活。由 α -淀粉酶本身启动子启动转录的重组 α -淀粉酶的表达活性为104.6ku/mL,与由噬菌体启动子启动的重组 α -淀粉酶的表达活性相当。*B. amyloliquefaciens* 中 α -淀粉酶基因的启动子常被用于进行外源基因的表达^[4]。该启动子的一个主要的特点是在对数生长期受阻遏,而在稳定期被自动激活。当重组菌株 *B. subtilis* AMY2 在对数生长后期受到热诱导时,重组 α -淀粉酶的转录由噬菌体启动子及其本身启动子的共同启动。在这种情况下,培养上清液中重组 α -淀粉酶的活性在诱导后8 h内可以达到262.4ku/mL,比单独由淀粉酶本身的启动子或噬菌体启动子启动的表达活性高出1倍以上(图4)。 *B. subtilis* AMY2 产酶培养上清液的SDS-PAGE分析结果如图5所示。在电泳图上只

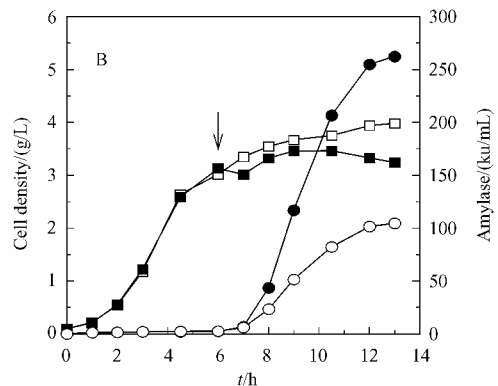


图4 菌株 *B. subtilis* AMY1 和 *B. subtilis* AMY2 合成重组 α -淀粉酶的时间曲线

Fig. 4 The time profile of recombinant α -amylase production from *B. subtilis* AMY1 and *B. subtilis* AMY2.

A): *B. subtilis* AMY1; B): *B. subtilis* AMY2. □, ○: cell growth and enzyme production without thermal induction, respectively; ■, ●: cell growth and enzyme production with heat shock, respectively. The arrows indicate the time when thermal induction was carried out.

有 3 个主要的条带,而重组 α -淀粉酶的条带是最大的,表明在诱导后没有出现胞内蛋白泄露的情况。

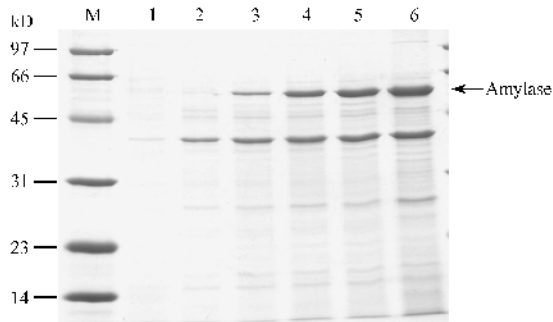


图 5 菌株 *B. subtilis* AMY2 培养上清液的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 5 The SDS-PAGE analysis of cultivation supernatant of *B. subtilis* AMY2 with thermal induction

M: the molecular weight marker; 1 to 6 are the samples taken at 2, 6, 8, 10, 12, 14 h after inoculation, respectively.

2.3 双启动子对重组 PGA 表达的影响

尽管所使用的培养基不同,由 *B. subtilis* PA1 表达重组 PGA 的模式与由 *B. subtilis* AMY1 表达重组 α -淀粉酶的模式非常相似,如图 6A 所示。在热诱导后的前 4h,重组 PGA 的表达非常旺盛,随后由于培养基中营养物质的消耗其表达逐渐减弱。在诱导后 8h 内重组 PGA 的活性可达 0.78 u/mL。在不进行热诱导的情况下 *B. subtilis* PA1 完全不表达重组 PGA。尽管重组 PGA 和重组 α -淀粉酶都由同一宿主菌进行表达,但对 α -淀粉酶表达有利的培养基不再适合于进行 PGA 的表达,其原因可能在于这两种蛋白质氨基酸组成的差异。用相同的表达系统表达不同蛋白时存在的表达效率差异在文献中也屡见报道,其原因在于所要表达的蛋白氨基酸组成和基因

的结构等方面存在的差异。

在没有热诱导的情况下,菌株 *B. subtilis* PA2 表达重组 PGA 的活性较低(0.019u/mL),如图 6B 所示。因为噬菌体的启动子受到严紧的调控,在此情况下 *pac* 基因的转录仅受其本身启动子的作用。当 *B. subtilis* PA2 在有热诱导的情况下产酶时,*pac* 的转录共同受噬菌体启动子及 *pac* 的本身启动子启动,培养上清液中 PGA 的活性在诱导后 6 h 内达到 1.66u/mL。在双启动子作用的情况下重组 PGA 的表达量相当于仅由噬菌体启动子作用时的 2 倍,相当于仅由 *pac* 本身启动子启动时的 90 倍(图 6)。在有热诱导的情况下菌株 *B. subtilis* PA2 培养上清液的 SDS-PAGE 分析如图 7 所示。结果表明培养上清液的蛋白质组成非常简单,在热诱导后几乎没有胞内蛋白泄露到培养液中。而且在电泳图上仅有两条条带分别对应于 PGA 的 α 和 β 亚基。值得注意的是在重组 α -淀粉酶表达中出现的两条非目的条带此时并没有出现,可能是由于所使用的培养基的差异而导致了这两个蛋白表达的差异。我们也采用和表达重组 α -淀粉酶相同的培养基进行了重组 PGA 的表达,在这种情况下 PGA 的表达效率较低,而且两个非特异的条带也得到了表达。

3 讨论

启动子是进行外源基因表达时所考虑的一个重要问题。为了得到高效的重组蛋白表达,使用强启动子是一个常用的手段。然而强启动子通常会发生“泄露”,即在无诱导的时候也会启动外源蛋白的少量表达。尽管表达量很少,在有些情况下也会影响对数生长期细胞的生长,从总体上来说不利于

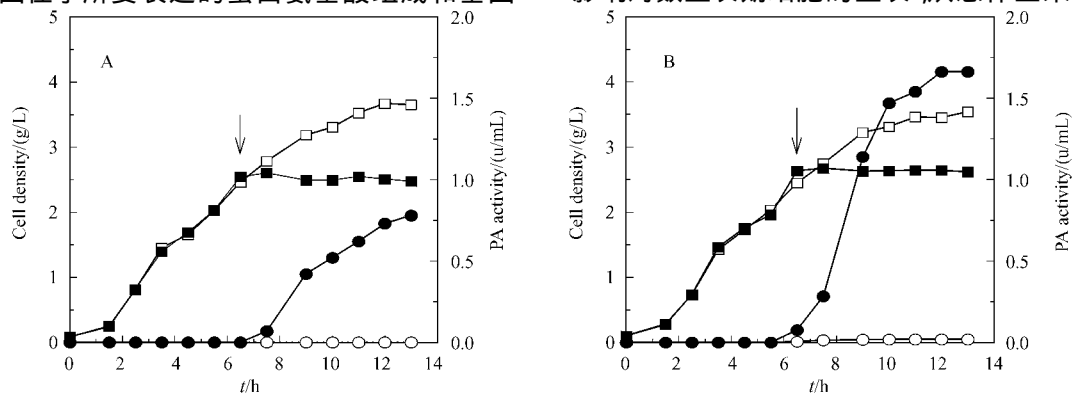


图 6 菌株 *B. subtilis* PA1 合成 *B. subtilis* PA2 重组 PGA 的时间曲线

Fig. 6 The time profile of recombinant penicillin acylase production from *B. subtilis* PA1 and *B. subtilis* PA2

A): *B. subtilis* PA1; B): *B. subtilis* PA2. \square, \circ : cell growth and enzyme production without heat shock, respectively; \blacksquare, \bullet : cell growth and enzyme production with heat shock, respectively. The arrows indicate the time when thermal induction was carried out.



图7 菌株 *B. subtilis* PA2 培养上清液的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 7 The SDS-PAGE analysis of the cultivation supernatant of *B. subtilis* PA2 with thermal induction

M: the protein molecular marker; 1 to 7 are the samples collected at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h after thermal induction.

外源蛋白的表达。使用双启动子则在某种程度上可以解决这一问题。这一策略是将两个中等强度的启动子以相同的方向置于所要表达的外源基因的上游。在没有诱导的情况下不会出现“泄露”,诱导后则由两个启动子共同启动外源基因的转录。因为双启动子可以提供更多的 RNA 聚合酶的结合位点,因此其强度要高于单启动子。已经有一些采用双启动子或多启动子进行外源基因表达的报道^[16,17]。

本文评价了在基于噬菌体 $\phi 105$ 构建的重组枯草杆菌表达系统中双启动子对外源蛋白表达的影响。并通过使用不同的重组菌株以及不同的诱导条件,比较了在外源基因本身启动子、噬菌体启动子和双启动子等不同转录调控模式下外源基因的表达效率(表1)。对于重组菌株 *B. subtilis* AMY1 和 *B. subtilis* PA1,在没有热诱导时没有启动子被激活,在有热诱导的情况下则只有噬菌体的启动子起作用。对于重组菌株 *B. subtilis* AMY2 和 *B. subtilis* PA2,没有热诱导时仅有外源基因本身所带的启动子起作用,有热诱导时则由双启动子启动外源基因的表达。

表1 在不同的诱导条件下不同重组菌株产酶的比较
Table 1 Comparison of α -amylase and penicillin acylase production from different recombinant strains under different induction conditions

Strain	Induction	Activated promoters	Productivity
<i>B. subtilis</i> AMY1	Non	Non	3.98ku/mL
<i>B. subtilis</i> AMY1	Heat shock	Phage promoter	112.6ku/mL
<i>B. subtilis</i> AMY2	Non	Native promoter	104.6ku/mL
<i>B. subtilis</i> AMY2	Heat shock	Dual promoters	262.4ku/mL
<i>B. subtilis</i> PA1	Non	Non	0
<i>B. subtilis</i> PA1	Heat shock	Phage promoter	0.78u/mL
<i>B. subtilis</i> PA2	Non	Native promoter	0.019u/mL
<i>B. subtilis</i> PA2	Heat shock	Dual promoters	1.66u/mL

除了没有启动子被激活的情况,三种不同的转录模式都取得了重组 α -淀粉酶的有效表达。其中由 *B. amyloliquefaciens* α -淀粉酶基因本身启动子启动的表达水平和由噬菌体启动子启动的表达水平相当,而由双启动子启动的表达水平最高,比上述两种情况高出1倍以上。与 *B. amyloliquefaciens* α -淀粉酶基因本身的启动子相反,*B. mageterium* PGA 基因自身启动子单独作用时很弱,只能使重组 PGA 少量表达。但当它与噬菌体的启动子共同作用时仍能有效地促进表达效率,与单独使用噬菌体启动子的情况相比重组 PGA 的表达效率提高约1倍。文献报道的 *B. mageterium* (ATCC14945) PGA 的表达水平为 $0.138 \mu\text{mL}^{-1}$ ^[18],本室保藏的 *B. mageterium* (ATCC14945) 菌株的 PGA 表达水平为 $0.093 \mu\text{mL}^{-1}$,而 *pac* 启动子单独在 *B. subtilis* 中起作用时 PGA 的表达水平仅为 $0.019 \mu\text{mL}^{-1}$ 。可见 *pac* 启动子在 *B. subtilis* 中仅能部分地发挥其作用。当两个启动子共同作用时所得到的表达水平高于两者单独作用之和,表明双启动子对外源蛋白表达的促进作用并不是对两个启动子作用的简单叠加,而是存在一定的协同作用。由于 RNA 聚合酶在启动子作用下进行基因转录的机制相当复杂,是如何产生这种协同作用的问题还有待于进一步的研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**: 411 - 421
- [2] Dubendorff JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *Journal of Molecular Biology*, 1991, **219**: 45 - 59
- [3] Wu XC, Ng SC, Near RI *et al*. Efficient production of a functional single chain antidigoxin antibody fragment via an engineered *Bacillus subtilis* expression system. *Bio/technology*, 1993, **11**: 71 - 76
- [4] Fahnestock SR, Fisher KE. Expression of the staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by gene fusion utilizing the promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase gene. *Journal of Bacteriology*, 1986, **165**: 796 - 804
- [5] Stewart V, Bledsoe PJ, Williams SB. Dual overlapping promoters control *napF* (periplasmic nitrate reductase) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**: 5862 - 5870
- [6] Irani M, Musso R, Adhya S. Cyclic-AMP-dependent switch in initiation of transcription from the two promoters of the *Escherichia coli gal* operon: identification and assay of 5'-triphosphate ends of mRNA by GTP:RNA guanylyltransferase. *Journal of Bacteriology*,

- [7] Paul S , Zhang X , Hulett FM. Two ResD-Controlled Promoters Regulate *ctaA* Expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* , 2001 , **183** : 3237 – 3246
- [8] Adachi T , Ymagata H , Tsukagoshi N *et al.* Multiple and tandemly arranged promoters of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47. *Journal of Bacteriology* . 1989 , **171** : 1010 – 1016
- [9] Lieto LD , Borrego F , You CH *et al.* Human CD94 gene expression : dual promoters differing in responsiveness to IL-2. *Journal of Immunology* , 2003 , **171** : 5277 – 5286
- [10] Chen QY , Jackson N. Human CD1D gene has TATA boxless dual promoters : an SP1-binding element determines the function of the proximal promoter. *Journal of Immunology* , 2004 , **172** : 5512 – 5521
- [11] Dyer KD , Rosenberg HF. The mouse RNase 4 and RNase 5/ang 1 locus utilizes dual promoters for tissue-specific expression. *Nucleic Acids Research* , 2005 , **33** : 1077 – 1086
- [12] Liu G (刘 刚) , Xing M (邢 苗) , Yu SW (余少文) . High-effective expression of thermostable α -amylase from a bacterial phage based recombinant *Bacillus subtilis*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* (应用与环境生物学报) , 2005 , **11** : 368 – 372
- [13] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular cloning , a laboratory manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [14] Park YS , Dohjima T , Okabe M. Enhanced α -amylase production in recombinant *Bacillus brevis* by fed-batch culture with amino acid control. *Biotechnology and Bioengineering* , 1996 , **49** : 35 – 44
- [15] Chow CP , Tseng JH , Lin MI *et al.* Manipulation of carbon assimilation with respect to expression of the *pac* gene for improving production of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* , 1999 , **69** : 27 – 38
- [16] Mertens N , Remaut E , Fiers W. Versatile , multi-featured plasmids for high-level expression of heterologous genes in *Escherichia coli* : overproduction of human and murine cytokines. *Gene* , 1995 , **164** : 9 – 15
- [17] Yu X , Zhan X , Costa J *et al.* Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Molecular Therapy* , 2003 , **7** : 827 – 838.
- [18] Pinotti L M , Silva A F , Silva R G , Giordano R L. Study of different media for production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Appl Biochem Biotechnol* . 2000 , **84 – 86** : 655 – 663