

## 利用枯草芽孢杆菌 *ytkA* 和 *ywoF* 基因启动子与信号肽重组分泌表达 *mpd* 基因

# Recombinant Expression and Secretion of *mpd* Gene Using the Promoters and Signal Peptide-encoding Sequences of *ytkA* and *ywoF* Gene from *Bacillus subtilis*

张晓舟, 闫 新, 崔中利, 李顺鹏\*

ZHANG Xiao-Zhou, YAN Xin, CUI Zhong-Li and LI Shun-Peng\*

南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**摘 要** 用大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pNW33N 和去除了信号肽编码序列的成熟 *mpd* 基因构建了穿梭启动子探针 pNW33N-*mpd*。用该探针从质粒 pMPDP3 和 pMPDP29 上克隆来自于枯草芽孢杆菌 *ytkA* 和 *ywoF* 基因上游的启动子功能片段, 构建了穿梭表达载体 pNYTM 和 pNYWM。将表达载体 pNYTM 和 pNYWM 转入枯草芽孢杆菌 1A751 获得表达菌株 1A751(pNYTM) 和 1A751(pNYWM), *mpd* 基因在 *ytkA* 和 *ywoF* 基因的启动子和信号肽的带动下实现了分泌表达且具有天然活性, 结果表明 *ytkA* 基因的启动子强度强于 *ywoF* 基因的启动子。利用 *ytkA* 基因的强启动子和 *nprB* 基因的分泌型信号肽编码序列构建了新的穿梭分泌表达载体 pYNMK, 并使 *mpd* 基因在枯草芽孢杆菌 WB800 中得到了更高分泌表达, 表达菌株 WB800(pYNMK) 在培养到第 84 h 时甲基对硫磷水解酶酶活达到最高值为 10.40 u/mL, 是出发菌株邻单胞菌 M6 表达量的 10.8 倍, 重组表达产物有 91.4% 分泌在培养基中。

**关键词** 枯草芽孢杆菌, *ytkA* 基因, *ywoF* 基因, 启动子, 信号肽, *mpd* 基因, 分泌表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0249-08

**Abstract** A shuttle promoter-probe vector pNW33N-*mpd* was constructed with the *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector pNW33N and the mature *mpd* gene without its signal peptide-encoding sequence. The promoter fragments of *B. subtilis ytkA* and *ywoF* gene were cloned from plasmid pMPDP3 and pMPDP29 then generated the shuttle expression vector pNYTM and pNYWM. Expression vectors pNYTM and pNYWM were transformed into *B. subtilis* 1A751 to construct the expression strain 1A751(pNYTM) and 1A751(pNYWM), in these strains, under the control of the promoters and signal peptides of *ytkA* and *ywoF* gene, *mpd* gene was expressed and secreted with its biological activity; the result showed that the promoter of *ytkA* gene is much stronger than that of *ywoF* gene. Then a new shuttle expression-secretion vector pYNMK was constructed using the *ytkA*

Received: October 27, 2005; Accepted: December 7, 2005.

This work was supported by the grants from the Chinese National Natural Science Foundation (No. 30300005), Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2004246070, 2004214102) and Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 2005BA516A02-01, 2005BA516A02-02).

\* Corresponding Author. Tel/Fax: 86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30300005), 国家“863 计划”(No. 2004246070, 2004214102)和国家科技攻关项目(No. 2005BA516A02-01, 2005BA516A02-02)资助。

gene promoter and the signal peptide-encoding sequence of *B. subtilis nprB* gene, the expression of *mpd* gene achieved a higher level using the *B. subtilis* WB800 as the host, the methyl parathion hydrolase activity accumulated to a maximum level of 10.40 u/mL after 84 h of cultivation at the late stationary phase, which was 10.8-fold higher than the expression level of the original *Plesiomonas* strain M6, about 91.4% of the recombinant expression production was secreted into the culture medium.

**Key words** *Bacillus subtilis*, *ythA* gene, *ywoF* gene, promoter, signal peptide, *mpd* gene, expression and secretion

人工合成的有机磷化合物在全世界被广泛用于杀虫剂和神经毒剂等用途<sup>[1]</sup>。有机磷化合物对人畜等有极高的毒性,其在环境中持续和大量的施用严重威胁着人畜健康及生态环境。用生物原位修复技术来解决有机磷有毒物质的污染由于其成本低廉、高效、易操作并且无二次污染而日益成为研究的热点<sup>[2,3]</sup>。应用微生物及其酶制剂进行有机磷农药污染的原位生物修复是一项非常有发展前景和重要意义的工作。本实验室曾经分离到一株邻单胞菌 M6 并克隆到一个全新的甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*<sup>[4]</sup>。有机磷水解酶可以高效地水解剧毒农药甲基对硫磷从而使其毒性下降 100~200 倍,国际上目前报道的产有机磷水解酶的微生物绝大多数为革兰氏阴性菌,且其水解酶为胞内酶或分泌在周质空间,影响了酶与底物的直接接触和反应,这不仅大大降低了其实际应用效果<sup>[5]</sup>,也使酶的分离和纯化工作比较繁琐。最近,有众多研究将有机磷水解酶(OPH)基因 *opd* 在大肠杆菌和恶臭假单胞菌中实现了细胞表面表达<sup>[6,7]</sup>,还有人将血红蛋白和 *opd* 共表达<sup>[8]</sup>或者提高 *opd* 的拷贝数<sup>[9]</sup>,这都在一定程度上提高了 OPH 的表达量或者对有机磷农药的降解效果。另外,在实际应用中,革兰氏阴性菌在环境中同土著微生物的竞争力较差,由于不能形成特殊的休眠结构,其活体微生物制品也很难在常温下长时间保存,这必然增加了其保存成本。

枯草芽孢杆菌是一种传统的酶制剂生产菌株,其细胞壁结构简单,不分泌内毒素,可直接将表达产物分泌到培养基中,对人畜安全,是美国食品药品监督管理局(FDA)和中国农业部批准使用的安全的菌株,是分泌表达外源基因的良好受体菌<sup>[10,11]</sup>。来自于 M6 的 *mpd* 基因在其自身的启动子的带动下不能够在芽孢杆菌中表达。本实验室曾利用 *mpd* 基因为报告基因构建新型启动子探针,以大肠杆菌为克隆宿主从枯草芽孢杆菌染色体上用鸟枪法克隆到一系列强启动子功能片段,但是尚未研究这些启动子功能片段在枯草芽孢杆菌中的启动强度<sup>[12]</sup>。在本研究中,我们利用先前克隆到的强启动子和信号肽编码序列构建大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭分泌表

达载体并在枯草芽孢杆菌中成功地分泌表达了 *mpd* 基因,其酶活远高于出发菌株并且可以使酶蛋白直接分泌到培养基中。枯草芽孢杆菌可以形成芽孢,发酵产品易保存,同时其环境竞争力和抗逆境能力也很强,发酵技术成熟且易于控制,这些优点将为我们应用其降解环境中的有机磷农药残留和生产无细胞的家用品酶制剂和解毒剂开辟一个新的途径并且具有广阔的发展前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 酶和引物 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 Taq 酶均为 TaKaRa 公司产品;引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.1.3 培养基:LB 培养基和 Superrich 培养基见参考文献 13, 14 ]

### 1.2 方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌总 DNA 的提取:枯草芽孢杆菌总 DNA 的提取参照参考文献 15 进行。

1.2.2 感受态细胞的制备:大肠杆菌和枯草芽孢杆菌普通感受态细胞的制备分别参照文献 13, 16 进行。

1.2.3 *mpd* 基因的克隆及穿梭启动子探针的构建:设计合成一对引物 P1 (5'-CGCGGATCCATGGCCGCA CCGCAGGTGCGCACCTCG-3') 和 P2 (5'-CGCAAGCTT TCATCATCACTTGGGCTTGACGACCGA-3'),以含有完整的 *mpd* 结构基因的质粒 pMTI<sup>[4]</sup>为模板,扩增去除了信号肽编码序列的成熟 *mpd* 基因片段,引物 P1 和 P2 分别在 *mpd* 基因的上下游引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(见下划线)。PCR 扩增片段经纯化回收后用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,然后克隆到穿梭载体 pNW33N 的相应位点,重组载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  新鲜感受态细胞,在含有氯霉素 25 $\mu$ g/mL 的 LB 平板上筛选转化子。挑取转化子提取质粒验证片段的插入,阳性克隆即为穿梭启动子探针 pNW33N-*mpd*。

1.2.4 穿梭表达载体 pNYM 和 pNYWM 的构建:将

表 1 供试菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype, phenotype, or description <sup>a</sup>	Source
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stored in this lab
<i>B. subtilis</i> 1A1	<i>trpC2</i>	From BGSC
<i>B. subtilis</i> 1A751	<i>apr bglT1 bglS<math>\Delta</math>EV eglS<math>\Delta</math>102 his npr</i>	From BGSC
<i>B. subtilis</i> WB800	<i>nprE aprE epr bpr mpr : :ble nprB : :bsr <math>\Delta</math>npr uprA : :hyg</i>	From Sui-Lam Wong
pMT1	Amp <sup>r</sup> , pUC19 vector with <i>mpd</i> fragment and its own promoter	Stored in this lab
pNW33N	Cm <sup>r</sup>	From BGSC
pNW33N-mpd	Cm <sup>r</sup> , pNW33N vector with promoterless <i>mpd</i> fragment	This work
pMPDP3	Amp <sup>r</sup> , pUC19 vector with <i>mpd</i> fragment and <i>ytkA</i> promoter	Stored in this lab
pMPDP29	Amp <sup>r</sup> , pUC19 vector with <i>mpd</i> fragment and <i>ywoF</i> promoter	Stored in this lab
pNYTM	Cm <sup>r</sup> , pNW33N vector with <i>mpd</i> fragment and <i>ytkA</i> promoter	This work
pNYWM	Cm <sup>r</sup> , pNW33N vector with <i>mpd</i> fragment and <i>ywoF</i> promoter	This work
pUC19	Amp <sup>r</sup>	Stored in this lab
pUB110	Km <sup>r</sup>	From BGSC
pUBC19	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector	This work
pYNMK	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pUBC19 vector with <i>mpd</i> fragment, <i>ytkA</i> promoter and <i>nprB</i> signal peptide encoding sequence	This work

<sup>a</sup> Amp<sup>r</sup>: Ampicillin resistance, Cm<sup>r</sup>: Chloramphenicol resistance, Km<sup>r</sup>: Kanamycin resistance.

克隆有枯草芽孢杆菌强启动子片段的质粒 pMPDP3 和 pMPDP29<sup>[12]</sup>用 *Sau*3A I 完全酶切,酶切产物经乙醇沉淀回收之后与经 *Bam*H I 酶切并脱磷酸化的穿梭启动子探针 pNW33N-mpd 进行酶连,酶连产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  并涂布含有甲基对硫磷 100 $\mu$ g/mL 和氯霉素 25 $\mu$ g/mL 的 LB 平板,挑取转化子周围具有黄色水解圈的克隆,即为 *mpd* 基因穿梭表达载体,分别命名为 pNYTM 和 pNYWM。

**1.2.5 枯草芽孢杆菌 1A751 表达菌株的构建:**提取表达载体 pNYTM 和 pNYWM,转化枯草芽孢杆菌 1A751<sup>[17]</sup>感受态细胞,在含有氯霉素 5 $\mu$ g/mL 的 LB 平板上筛选转化子,转化子命名为 *B. subtilis* 1A751 (pNYTM) 和 *B. subtilis* 1A751 (pNYWM)。

**1.2.6 穿梭载体 pUBC19 的构建:**用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切来自于革兰氏阳性菌的质粒 pUB110<sup>[18]</sup>,酶切产物经 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳纯化后回收含有复制酶 *rep* 基因和卡那霉素抗性基因的片段,回收片段克隆至大肠杆菌质粒 pUC19 的相应位点,重组载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,在含有氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL 的 LB 平板上筛选转化子。重组载体即为大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体,命名为 pUBC19。

**1.2.7 利用 *ytkA* 基因启动子和 *nprB* 基因信号肽编码序列构建分泌表达载体:**设计合成引物 P3 (5'-GCGGGATCCTTTTTTGTGACG-3') 和 P4 (5'-GAAAGGGTGATGCCATGCCAACTTGACCAAG-3') 扩增 *ytkA* 基因的启动子区,引物 P3 在扩增片段的 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点;设计另外一对引物 P5 (5'-CTTGGTCAAGTTGCGCATGCCATCACCCCTTTC-3')

和 P6 (5'-GCGCTGCAGCTGAGGCATG-3') 以枯草芽孢杆菌 1A1 的总 DNA 为模板,扩增其胞外中性蛋白酶 *nprB* 基因的信号肽编码序列,引物 P4 在扩增片段的 3' 端引入 *Pst* I 酶切位点。用引物 P7 (5'-GCGCTGCAGCACC GCAGGTG-3') 和 P2 扩增出去除了信号肽编码序列的 *mpd* 基因片段并在 5' 端引入 *Pst* I 酶切位点。用重叠延伸拼接法 (SOE)<sup>[19]</sup> 将 *ytkA* 启动子片段和 *nprB* 信号肽编码序列拼接后用 *Pst* I 酶切并与同样酶切的 *mpd* 基因片段酶连,酶连产物经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后克隆到穿梭载体 pUBC19 的相应位点,即为穿梭分泌表达载体,命名为 pYNMK。重组载体 pYNMK 的详细构建路线见图 1。

**1.2.8 枯草芽孢杆菌 WB800 表达菌株的构建:**提取表达载体 pYNMK,转化枯草芽孢杆菌 WB800<sup>[20]</sup>感受态细胞,在含有卡那霉素 20 $\mu$ g/mL 的 LB 平板上筛选转化子,转化子命名为 *B. subtilis* WB800 (pYNMK)。

**1.2.9 甲基对硫磷水解酶 (MPH) 活性检测及活力测定:**在加有甲基对硫磷 250 $\mu$ g/mL 的 LB 平板上用牙签点种大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的转化子,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱保温,观察是否有黄色的水解圈出现。MPH 活力单位定义及酶活力测定方法见文献 [12]。

**1.2.10 枯草芽孢杆菌表达菌株的发酵试验:**将表达菌株接种于 3mL 液体 Superrich 培养基中,其中 *B. subtilis* 1A751 (pNYWM) 和 *B. subtilis* 1A751 (pNYTM) 在培养基中添加氯霉素 5 $\mu$ g/mL, *B. subtilis* WB800 (pYNMK) 添加卡那霉素 20 $\mu$ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日以 2.0% 的接种量接种于 200mL 同样的

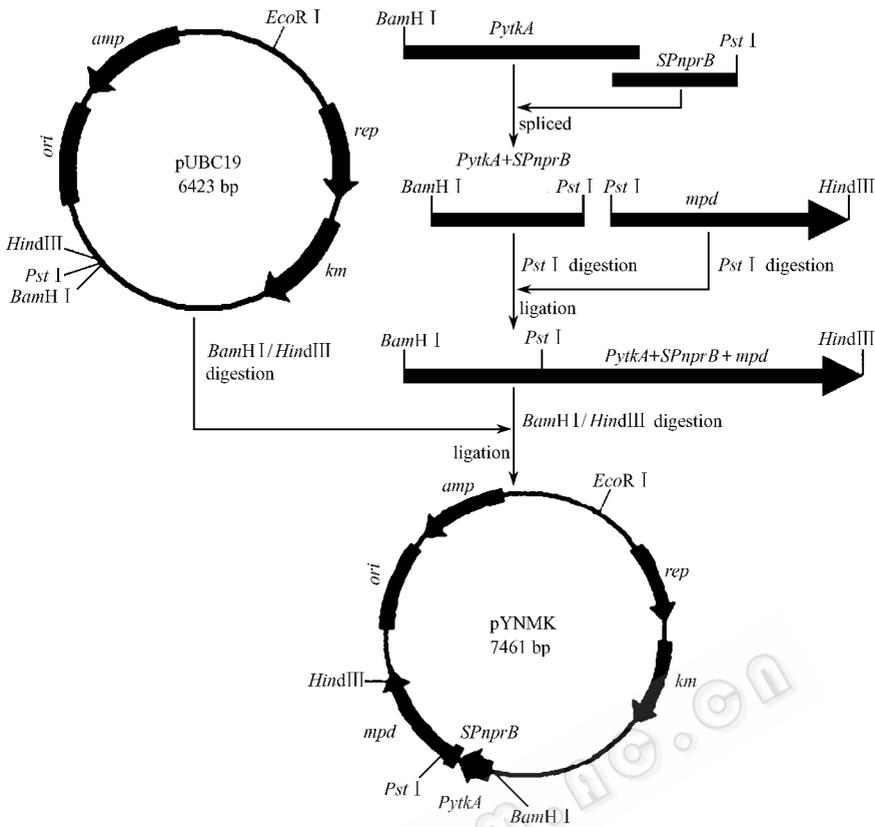


图 1 穿梭分泌表达载体 pYNMK 的构建路线图

Fig. 1 The construction of the shuttle expression-secretion vector pYNMK

培养基中 37℃ 250r/min 摇床振荡培养。定时取样测定发酵液在 600nm 处的吸光值；同时测定发酵液的 MPH 酶活，发酵液 12000r/min 离心 5min 后取上清检测上清中的 MPH 酶活。

**1.2.11 重组表达 MPH 的 SDS-PAGE 检测和酶谱分析** 将出发菌株邻单胞菌 M6 的培养液用超声波破碎后 12000r/min 离心 5min 后取上清，同时取 WB800 表达菌株的发酵液上清及含有空载体 pUBC19 的菌株的发酵液上清进行 SDS-PAGE 和酶谱分析实验。SDS-PAGE 和酶谱分析方法见参考文献 [21]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 穿梭启动子探针 pNW33N-mpd 的构建和鉴定

本实验室曾经利用启动子探针 pUC19-mpd<sup>[12]</sup> 从枯草芽孢杆菌染色体 DNA 启动子基因文库中钓取了一系列启动子功能片段，其中启动子阳性克隆 pMPDP3 和 pMPDP29 中分别克隆到了 *ytkA* 和 *ywoF* 两个功能未知基因上游的强启动子及信号肽功能片段<sup>[12]</sup>。但是由于 pUC19-mpd 为大肠杆菌载体，所以 pMPDP3 和 pMPDP29 并不能在枯草芽孢杆菌中复制并表达 *mpd* 基因，这就要求我们构建穿梭表达载

体来验证上述两个启动子在枯草芽孢杆菌中的功能。在本研究中，我们首先用 *mpd* 基因构建了穿梭启动子探针 pNW33N-mpd，然后从 pMPDP3 和 pMPDP29 中重新把 *ytkA* 和 *ywoF* 的启动子钓出来，从而构建 *mpd* 基因穿梭表达载体 pNYTM 和 pNYWM。

PCR 扩增去除了信号肽编码序列的 *mpd* 基因片段见图 2，将扩增到的 *mpd* 基因片段双酶切后克隆到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pNW33N 的相应位点，重组载体 pNW33N-mpd 的酶切验证及电泳图谱见图 2，图谱证实 *mpd* 基因 PCR 片段已经成功克隆至该载体。

在载体 pNW33N-mpd 中，*mpd* 基因的转录方向与其下游的 *Plac* 启动子方向相对（图 3），因此 *mpd* 基因在其上游多克隆位点没有外源启动子插入的情况下不会表达；当有合适的启动子元件插入到该载体的 *mpd* 基因上游的多克隆位点时，*mpd* 基因才会得以表达，因此，它可以作为启动子探针来克隆启动子片段。同时，由于该探针为穿梭载体，在通过其克隆到启动子之后不需要额外的启动子亚克隆工作便可以直接转入枯草芽孢杆菌进行报告基因的表达及

启动子强度的分析。

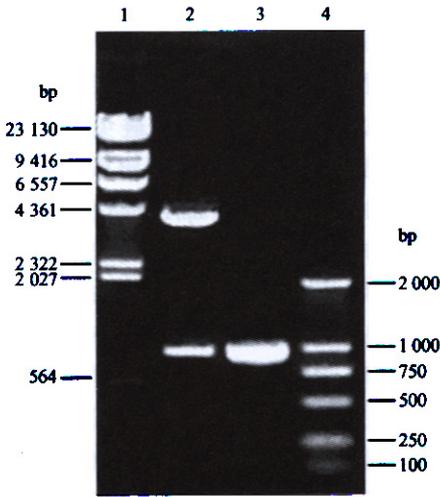


图 2 穿梭启动子探针 pNW33N-*mpd* 的酶切验证图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product and pNW33N-*mpd*

1:  $\lambda$ -*Hind* III marker; 2: pNW33N-*mpd* digested with *Bam*H I / *Hind* III; 3: *mpd* PCR product, 4: DL2000 marker.

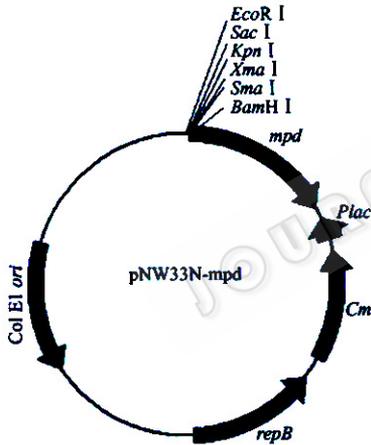


图 3 质粒 pNW33N-*mpd* 基因图谱

Fig. 3 Genetic map of pNW33N-*mpd*

由于 MPH 可以水解甲基对硫磷并生成亮黄色的对硝基酚,因此我们构建的启动子探针可以通过观察在选择性平板上转化子菌落周围是否产生黄色的水解圈来方便地鉴定出携带启动子功能片段的阳性克隆,同时,还可以通过测定 MPH 的活性来确定和比较克隆到的不同启动子的强度。

### 2.2 穿梭表达载体 pNYTM 和 pNYWM 的构建和转化

将启动子阳性克隆载体 pMPDP3 和 pMPDP29 的 *Sau*3A I 酶切消化片段与经 *Bam*H I 酶切的脱磷载体 pNW33N-*mpd* 酶连后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取具有甲基对硫磷水解酶活性的阳性克隆。得到了两个

插入外源片段最小的阳性克隆 pNYTM 和 pNYWM。载体 pNYTM 和 pNYWM 经测序后证实其克隆到的启动子片段确为 pMPDP3 和 pMPDP29 中的 *ytkA* 和 *ywoF* 的启动子功能片段。将两个表达载体转化到 *B. subtilis* 1A751 后得到枯草芽孢杆菌表达菌株 *B. subtilis* 1A751 (pNYTM) 和 *B. subtilis* 1A751 (pNYWM)。

### 2.3 枯草芽孢杆菌表达菌株甲基对硫磷水解酶表达活性的定性检测

*mpd* 基因的表达产物 MPH 能够高效水解无色的甲基对硫磷并且生成亮黄色的对硝基苯酚,利用这个反应特点,可以非常容易地检测 *mpd* 基因是否在表达菌株得到功能性表达。将隔夜培养的大肠杆菌和枯草杆菌表达菌株用牙签点种在含有甲基对硫磷的 LB 平板上,并点种不含表达载体的菌株作为对照。点种之后培养一段时间,可以观察到大肠杆菌和枯草杆菌表达菌株的菌苔周围均有亮黄色的水解圈的产生(图 4),证明 *mpd* 基因在枯草杆菌启动子和信号肽的调控下,在枯草杆菌中实现了活性表达。



图 4 表达菌株的重组表达 MPH 活性检测

Fig. 4 Detection of MPH activity of the engineered strain

1: *B. subtilis* 1A751(pNW33N-*mpd*); 2: *E. coli* (pNW33N-*mpd*); 3: *E. coli* (pNYTM); 4: *E. coli* (pNYWM); 5: *B. subtilis* 1A751 (pNYTM); 6: *B. subtilis* 1A751(pNYWM).

### 2.4 表达菌株 *B. subtilis* 1A751 (pNYTM) 和 *B. subtilis* 1A751 (pNYWM) 菌株的发酵试验

枯草杆菌 1A751(pNYTM) 和 1A751(pNYWM) 在 Superrich 培养基中摇瓶培养的生长曲线和发酵液的 MPH 酶活变化曲线见图 5。

从图 5 中可以看出,在 *ytkA* 和 *ywoF* 基因不同的启动子带动下, *mpd* 基因在枯草杆菌中的表达水平相差很大。1A751(pNYWM) 表达菌株的表达水平很低,MPH 酶活在对数生长期不断升高,在稳定期前期培养至第 18 h 时酶活达到最高值 0.50u/mL 后

便呈平缓下降的趋势。而 1A751(pNYTM)菌株的 *mpd* 基因在其对数生长期和稳定期都能够迅速而高

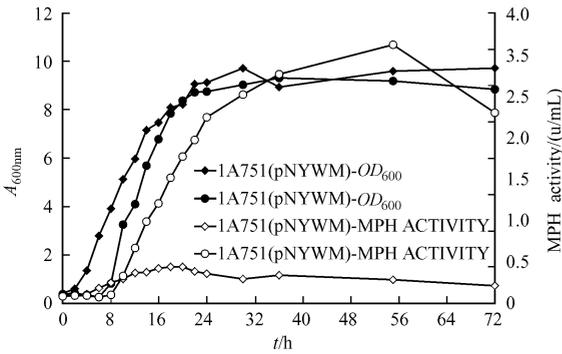


图5 表达菌株 1A751(pNYTM)和 1A751(pNYWM)的生长和 MPH 酶活曲线

Fig. 5 Growth and MPH activity curve of *B. subtilis* 1A751(pNYTM) and 1A751(pNYWM)

效地表达,在稳定期后期培养至第 55 h 时 MPH 酶活达到最高值 3.57u/mL,随后酶活有明显的下降,我们推测该酶活的下降是因为宿主菌稳定期后期某种蛋白酶的表达造成的,有关枯草杆菌蛋白质组学最新文献报道枯草杆菌至少表达 27 种蛋白酶,而且大部分都在稳定期表达<sup>[22]</sup>,而 1A751 只敲除了 2 个蛋白酶基因,难免表达产物在稳定期后期会有一定的降解。发酵液离心后取上清测定 MPH 酶活发现,1A751(pNYTM)发酵液的上清检测不到酶活,这应与 *ytka* 基因的脂蛋白信号肽的特殊性有关<sup>[23]</sup>,*ytka* 基因的信号肽为一典型的脂蛋白信号肽,我们推测脂蛋白信号肽在和 *mpd* 基因融合表达之后,融合蛋白 N-端的半胱氨酸经过脂修饰、切除信号肽之后与原生质膜相结合,而融合蛋白在质膜的外侧折叠后行使其功能,从而在质膜表面嵌合形成一种疏水端-亲水端的特殊的稳定的存在形式,如果将 *ytka* 基因的信号肽编码序列换成分泌型蛋白的信号肽编码序列,将有望实现表达产物直接分泌到培养基中去。1A751(pNYWM)发酵液的上清酶活占发酵液总酶活的 87.3%左右,这也恰好证实了我们以往对 *ywoF* 基因的信号肽为分泌型信号肽的预测<sup>[12]</sup>。从两个枯草芽孢杆菌表达菌株的 MPH 的表达水平来看,*ytka* 基因的启动子强度远远强于 *ywoF* 基因的启动子,而在大肠杆菌中,*ywoF* 基因的启动子却强于 *ytka* 基因的启动子<sup>[12]</sup>,这说明一个启动子在大肠杆菌中是强启动子并不一定在枯草芽孢杆菌中也是强启动子,今后直接利用我们新构建的穿梭启动子探针 pNW33N-*mpd* 克隆枯草芽孢杆菌启动子功能片段并直接在枯草芽孢杆菌宿主中比较其启动子强度将

更有意义。

## 2.5 分泌表达载体 pYNMK 的构建和转化

为了利用在枯草芽孢杆菌中较强的 *ytka* 基因的启动子实现 *mpd* 的高水平表达,使目的蛋白分泌到培养基中去并且最大限度地避免目的蛋白的降解,我们根据文献报道选择了分泌效率较高的枯草芽孢杆菌中性蛋白酶基因 *nprB* 的信号肽<sup>[24]</sup>来重新构建表达载体以实现甲基对硫磷水解酶的高效分泌表达,并且采用了缺失了 8 种蛋白酶基因的枯草芽孢杆菌 WB800 作为宿主菌。由于 WB800 具有氯霉素抗性,来源于 pNW33N 的表达载体不能够应用于 WB800。为了构建一个可以应用于 WB800 菌株的穿梭载体,将阳性质粒 pUB110 的含有卡那霉素抗性基因和复制酶基因及复制起始位点的 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切片段克隆到大肠杆菌载体 pUC19 的相应位点构建了新的穿梭载体 pUBC19。*ytka* 基因启动子片段和 *nprB* 基因的信号肽编码序列的 PCR 扩增产物见图 6,2 个 PCR 片段拼接之后与 *mpd* 基因片段连接,然后克隆到穿梭载体 pUBC19 的 *Bam* H I / *Hind* III 位点构建了穿梭分泌表达载体 pYNMK,该载体酶切验证图谱见图 6。穿梭分泌表达载体 pYNMK 转入 WB800 后获得表达菌株 WB800 (pYNMK)。

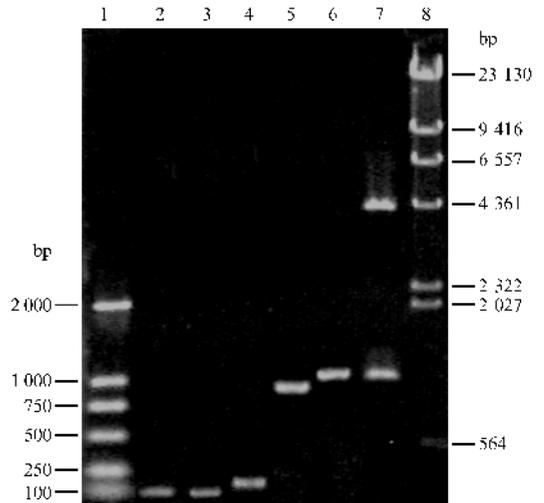


图6 穿梭分泌表达载体 pYNMK 的构建图谱

Fig. 6 The construction of shuttle expression-secretion vector pYNMK

1:  $\lambda$ -HindIII marker; 2: PCR product of *ytka* promoter; 3: PCR product of *nprB* signal peptide encoding sequence; 4: overlap extension product of *ytka* promoter and *nprB* signal peptide encoding sequence; 5: PCR product of *mpd* gene; 6: ligation product of promoter-signal peptide encoding sequence and *mpd* gene; 7: pYNMK digested with *Bam* H I / *Hind* III

## 2.6 表达菌株 WB800(pYNMK)的发酵试验及重组 MPH 分析

枯草芽孢杆菌 WB800(pYNMK)在 Superrich 培养基中摇瓶培养的生长曲线和发酵液的 MPH 酶活变化曲线见图 7。从图 7 中可以看出,在 *ytkA* 基因启动子和 NprB 信号肽的带动下,*mpd* 基因在 WB800 宿主中得到了更高水平的表达。在稳定期后期第 84 h 时 MPH 酶活达到最高值为 10.40 u/mL,是出发菌株邻单胞菌 M6 表达量(0.96 u/mL)的 10.8 倍。稳定期后期酶活基本保持稳定没有明显的降解现象。检测发酵液上清酶活发现有 91.4% 的酶活在上清液中,这表明我们利用 *nprB* 基因的信号肽成功地实现了 MPH 的跨膜分泌并且分泌到培养基中。枯草

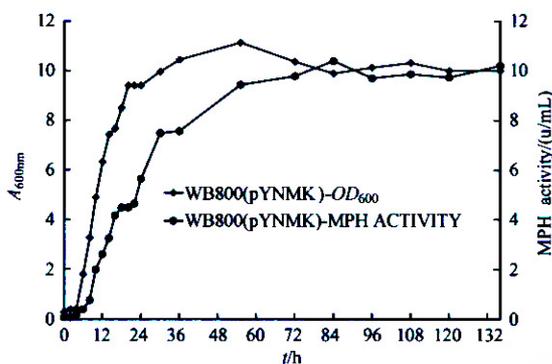


图 7 表达菌株 WB800(pYNMK)的生长和 MPH 酶活曲线

Fig. 7 Growth and MPH activity curve of *B. subtilis* WB800(pYNMK)

芽孢杆菌 WB800 缺失了 8 种蛋白酶活性并且 pUB110 来源的穿梭载体 pUBC19 具有更高的拷贝数和稳定性,可能是以上因素使 *mpd* 基因得到了更高水平的分泌表达。WB800 表达菌株的发酵液上清中重组 MPH 的 SDS-PAGE (2~4 泳道)和酶谱 (5~7 泳道)分析见图 8,从图 8 第 4 泳道可以看出在表达菌株发酵液上清中出现一条重组表达 MPH 明显的表达条带(箭头处);相对于原始菌株 M6 表达的 MPH,重组表达的 MPH 在枯草杆菌发酵液上清中更加纯净,这将对今后的分离纯化工作非常有利。从酶谱分析可以看出,重组 MPH 具有天然生物活性并且大小和原始菌株表达的 MPH 一致,这表明与 MPH 融合的 NprB 信号肽片段已经被正确切割。

## 2.7 小结

枯草芽孢杆菌的模式菌株 168 的基因组测序已于 1997 年完成,其庞大的基因组序列中有大部分的功能未知基因资源尚待研究和开发<sup>[25]</sup>。在枯草芽孢杆菌表达系统中,目前国际上常用的启动子是 *sacB* 基因启动子,淀粉酶基因启动子和 P43 启动

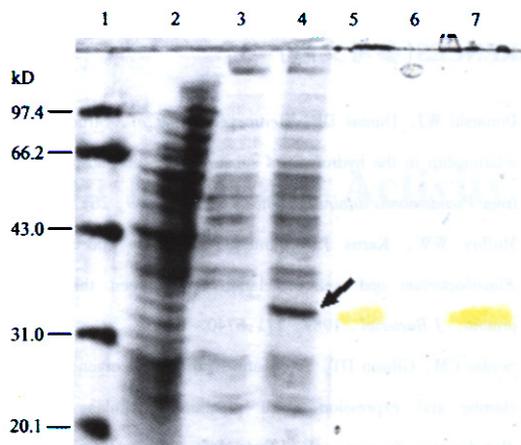


图 8 重组表达 MPH 的 SDS-PAGE 和酶谱分析

Fig. 8 SDS-PAGE and zymogram analysis of recombinant expressed MPH

1: molecular mass markers; 2, 5: supernatant of the M6 cell fraction; 3, 6: culture supernatant of WB800(pUBC19); 4, 7: culture supernatant of WB800(pYNMK).

子,启动子资源相对较少,从枯草芽孢杆菌基因组中克隆新的强启动子功能片段以构建强表达载体是一项很有意义的工作。本研究构建了新的穿梭启动子探针 pNW33N-*mpd* 并首次利用枯草芽孢杆菌 *ytkA* 和 *ywoF* 基因的启动子功能片段构建了 *mpd* 基因的穿梭表达载体,实现了 *mpd* 基因在枯草芽孢杆菌中 1A751 中的表达。进而利用较强的 *ytkA* 基因启动子功能片段和 *nprB* 基因的秘密型信号肽编码序列构建了 *mpd* 基因的秘密表达载体,实现了 *mpd* 基因在缺失了 8 个蛋白酶的枯草芽孢杆菌 WB800 高效表达并且分泌到培养基中。结果表明,我们所克隆到的 *ytkA* 基因的启动子是一个在枯草芽孢杆菌的对数和稳定生长期都能够持续发挥作用的强启动子,其将是在枯草芽孢杆菌中高效表达外源基因的一个良好元件;*ywoF* 基因的启动子虽然较弱,但是其典型的脂蛋白信号肽不失为一个枯草芽孢杆菌表面展示表达系统的好材料。同时,本工作也为我们将来利用枯草芽孢杆菌工程菌来提高环境中的有机磷农药残留污染的原位生物修复效果和大量生产纯化 MPH 以用于家用型酶制剂或解毒剂的生产奠定了基础。

致谢 感谢美国芽孢杆菌保藏中心 (*Bacillus* Genetic Stock Center, BGSC) Daniel Zeigler 教授惠赠枯草芽孢杆菌 1A1、1A751 和质粒 pNW33N 及 pUB110;感谢加拿大卡尔加里大学 Sui-Lam Wong 博士慷慨赠送枯草芽孢杆菌 WB800。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Donarski WJ, Dumas DP, Heitmeyer DP *et al.* Structure-activity relationship in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, 1989, **28**:4650 – 4655
- [ 2 ] Mulbry WW, Kams JS. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *J Bacteriol*, 1989, **171**:6740 – 6746
- [ 3 ] Serdar CM, Gibson DT. Enzymatic hydrolysis of organophosphates: cloning and expression of a parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta*. *Bio/Technology*, 1985, **3**:567 – 571
- [ 4 ] Cui ZL, Li SP, Fu GP. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**:4922 – 4925
- [ 5 ] Hung SC, Liao JC. Effects of ultraviolet light irradiation in biotreatment of organophosphates. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **56**:37 – 47
- [ 6 ] Mansee AH, Chen W, Mulchandani A. Biotoxification of coumaphos insecticide using immobilized *Escherichia coli* expressing organophosphorus hydrolase enzyme on cell surface. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, **5**:436 – 440
- [ 7 ] Wang AA, Mulchandani A, Chen W. Specific adhesion to cellulose and hydrolysis of organophosphate nerve agents by a genetically engineered *Escherichia coli* strain with a surface-expressed cellulose-binding domain and organophosphorus hydrolase. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**:1684 – 1689
- [ 8 ] Kang DG, Kim JYH, Cha HJ. Enhanced detoxification of organophosphates using recombinant *Escherichia coli* with co-expression of organophosphorus hydrolase and bacterial hemoglobin. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**:879 – 883
- [ 9 ] Wu CF, Valdes JJ, Rao G *et al.* Enhancement of organophosphorus hydrolase yield in *Escherichia coli* using multiple gene fusions. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **75**:100 – 103
- [ 10 ] Doi RH, Wong SL, Kawamura F. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins. *Trends Biotechnol*, 1986, **4**:232 – 235
- [ 11 ] Chang S. Engineering for protein secretion in gram-positive bacteria. *Methods Enzymol*, 1987, **153**:507 – 516
- [ 12 ] Cui ZL, Zhang XZ, Zhang ZH *et al.* Construction and application of a promoter-trapping vector with methyl parathion hydrolase gene *mpd* as the reporter. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**:1115 – 1118
- [ 13 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 14 ] Halling SM, Sanchez-Anzaldo FJ, Fukuda R *et al.* Zinc is associated with the beta subunit of DNA dependent RNA polymerase of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1977, **16**:2880 – 2884
- [ 15 ] Doi RH. Isolation of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA. In: Rodriguez RL, Tait RC *eds.* *Recombinant DNA Techniques*. Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass, 1983, pp. 162 – 163
- [ 16 ] Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1961, **81**:741 – 746
- [ 17 ] Wolf M, Attila G, Ortwin S *et al.* Genes encoding xylan and  $\beta$ -glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology*, 1995, **141**:281 – 290
- [ 18 ] Bashkirov VI, Milshina NV, Prozorov AA. Nucleotide sequence and functional map of kanamycin-resistant plasmid pUB110 from *Staphylococcus aureus*. *Genetika (USSR)*, 1986, **22**:1081 – 1092
- [ 19 ] Ho SN, Hunt HD, Horton RM *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, **77**:51 – 59
- [ 20 ] Wu SC, Yeung JC, Duan Y *et al.* Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**:3261 – 3269
- [ 21 ] Fu GP, Cui ZL, Huang TT *et al.* Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase. *Protein Express Purif*, 2004, **36**:170 – 176
- [ 22 ] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD *et al.* Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**:207 – 233
- [ 23 ] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH *et al.* Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64**:515 – 547
- [ 24 ] Nagarajan V, Ramaley R, Albertson H *et al.* Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**:3894 – 3898
- [ 25 ] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, **390**:249 – 256