

低温菌启动子探针质粒的构建

Construction of Promoter Probe Vector for a Cold-adapted Bacterium *Acinetobacter* sp. DWC6

魏云林* , 林连兵 , 季秀玲 , 井申荣

WEI Yun-Lin* , LIN Lian-Bing , JI Xiu-Ling , JING Shen-Rong

昆明理工大学生物工程技术研究中心 , 昆明 650224

Biotechnology Research Center of Kunming University of Science and Technology , Kunming 650224 , China

摘 要 为了在宿主菌 *Acinetobacter* sp. DWC6 中构建低温菌蛋白表达载体 , 以 pBR322 质粒为基础 , 去除质粒上 β -内酰胺酶基因的启动子片段 , 取而代之为来源于质粒 pJRD215 的卡那霉素抗性基因片段 , 并在 pBR322 中插入 *Acinetobacter* 菌属特异性 *ori* 的 DNA 片段 , 构建了能在 *Acinetobacter* sp. DWC6 和 *E. coli* 中正常复制的启动子探针质粒 pBAP1。通过在质粒 pBAP1 中的 β -内酰胺酶基因上游随机导入 *Acinetobacter* sp. DWC6 基因组片段 , 通过检测宿主细胞的氨苄青霉素抗性和 β -内酰胺酶活性 , 来筛选强启动子片段 , 并分析了启动子探针质粒载体的功能及启动子的强度。

关键词 低温菌 , 启动子探针质粒载体 , β -内酰胺酶

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0530-05

Abstract In order to build a protein expression system in a cold-adapted bacterium *Acinetobacter* sp. DWC6 , a promoter probe vector was constructed based on the plasmid pBR322. A fragment containing the promoter of the β -lactamase gene (the ampicillin resistance gene) in pBR322 was eliminated and replaced by a fragment comprising a kanamycin resistance gene amplified from pJRD215. DNA fragment harboring in the *Acinetobacter* species specific *ori* was also inserted into the plasmid pBR322 to construct a promoter probe vector named pBAP1 , which could replicate both in *E. coli* and in *Acinetobacter* sp. DWC6. The promoter selection library was constructed by randomly inserting genomic DNA fragment of *Acinetobacter* sp. DWC6 at upstream of reported gene , and target promoters were screened from genomic library on ampicillin selection plates. The function of pBAP1 and isolated promoters were determined by detection of the ampicillin sensitivity and the expression level of β -lactamase in the host cell.

Key words cold-adapted bacterium , promoter probe vector , β -lactamase

低温微生物产生的低温酶因其在低温发酵工业中的独特优势 , 而在研究中日益受到关注 , 并显示出日益广阔的应用前景。当前 , 来源于低温微生物的低温蛋白酶已经开始用于食品洗涤和化学合成等工业领域^[1,2,3] , 低温菌对许多污染物具有相对较高的

降解转化作用使其在低温条件下对污水处理、污染物的生物降解表现出明显的优势^[4,5]。

目前 , 对低温酶还缺乏高效的表达系统 , 许多重要的低温酶及功能性蛋白在当前的常温菌蛋白表达系统中难以表达 , 其中一个主要原因是常用表达质

Received : October 30 , 2006 ; Accepted : December 12 , 2006 .

This work was supported by the grant from the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars , State Education Ministry .

* Corresponding author . Tel : + 86-871-3801018-205 ; Fax : + 86-871-3801191 ; E-mail : weiyunlin@ yahoo . com . cn

教育部留学回国人员科研启动基金资助。

粒上的启动子无法正常启动外源低温蛋白的转录,或者即使表达,也因为低温蛋白或目的蛋白的热稳定性差而容易失活,或形成无功能的包涵体。因此分离能在低温下高效启动低温及特殊功能蛋白转录的启动子显得尤为重要。

构建低温蛋白表达系统对解决常见的外源蛋白表达后非正确折叠而导致活性降低也具有特殊意义。在常温蛋白表达系统中,大量表达的目的蛋白常因部分区段的分子间疏水相互作用而相互粘接,导致蛋白正常的折叠顺序不能完成而影响蛋白的活性,其中包括包涵体的形成^[6]。一些很难表达的蛋白通过常温宿主菌在一定的低温下培养实现了表达,但常温宿主菌的生理特征决定了它在低温下生长的限度,所以要找到常温蛋白表达系统在低温下表达有活性的目的蛋白的最佳温度条件也并非易事,蛋白的低温表达能很大程度减少包涵体的形成,增加表达蛋白的可溶性、折叠的正确性和蛋白的活性^[7],因此构建以低温菌为宿主细胞的低温蛋白表达系统成为解决以上问题的有效方法。

鉴于大多数低温酶在当前的常温菌蛋白表达系

统中难以高效表达,构建以低温菌为宿主的低温蛋白表达系统显得尤为重要,本研究以从低温菌中筛选出低温强启动子为目标,构建了一系列以 β -内酰胺酶为报告基因并能在 *Escherichia coli* 和 *Acinetobacter sp.* DWC6 中正常复制的启动子探针质粒载体。通过在质粒 pBAP1 中的 β -内酰胺酶基因上游随机导入 *Acinetobacter sp.* DWC6 基因组片段,通过检测宿主细胞的氨苄青霉素抗性和 β -内酰胺酶活性,来筛选强启动子片段,并分析了启动子探针质粒载体的功能及启动子的强度。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株

Acinetobacter sp. DWC6 菌株分离自冻土^[8],作为分离启动子片段的菌株和启动子探针质粒的宿主细胞;*Escherichia coli* JM109 作为构建启动子探针和扩增质粒的宿主菌。

1.2 质粒

本研究所用质粒见表 1。

表 1 本研究所用质粒列表
Table 1 Plasmids used in this study

Plasmid	Size	Markers	Genetic features	Source
pBR322	4.4kb	Amp, Tc	Synthetic cloning vector	Davison <i>et al.</i>
pWH1266	8.9kb	Amp	Fusion of pBR322 and pWH1277	ATCC77092
pJRD215	10.2kb	Km, Sm	Cojugation cosmid vector	Messing <i>et al.</i>
pBAPT	4.67kb	Km	pBR322 derivative lacking the promoter of the β -lactamase gene	This work
pBAP1	6.011kb	Km	pBAPT derivative with <i>ori</i> of <i>Acinetobacter</i>	This work

1.3 启动子探针载体的构建

用限制性内切酶 *Ssp* I 和 *Sal* I 酶切 pBR322 质粒,去除 0.8kb 含有 β -内酰胺酶基因(氨苄抗性基因)启动子的片段,同时插入 1.1kb 带有卡那霉素(Km)抗性基因的片段。此片段是以 pJRD215 为模板,利用 KOD plus DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增获得。两侧引物序列为:5'-CCCAAAGCTTGGATCCCGGGTATGGACAGCAAGCGAACCGGAA-3' 和 5'-CGGAATTCGTCGACTGGCGGAAGAAGCTCCAGCATGAGA-3',分别退火至卡那抗性基因的 5'和 3'区域,在 5'端引入多克隆位点 *Hind* III, *Bam* H I 和 *Sma* I,并在 3'端引入 *Eco* R I 和 *Sal* I 位点,构建成 pBAPT 质粒。pBAPT 经 *Acc* III 酶切后与 1.3kb 含有 *Acinetobacter* 菌属特异性复制起始位点(*ori*)的 DNA 片段连接,构建成质粒 pBAP1。为了使 *ori* 的 DNA 片段两端也带上 *Acc* III 位点,以便与经 *Acc* III 酶切的 pBAPT 连接,特设计引物如下:5'-CACACACATCCGGAGATCGTA

GAAATATCTATGATT-3' 和 5'-CACACACATCCGGAGGATTTTAAACATTTTGCCTTGT-3',用 KOD plus 从质粒 pWH1266 中扩增 *ori* 片段。新构建的质粒 pBAP1 含有启动子缺失的报告基因 β -内酰胺酶,在其上游有 *Hind* III, *Bam* H I 和 *Sma* I 的多酶切位点,启动子探针 pBAP1 的构建如图 1 所示。

1.4 启动子的筛选

Acinetobacter sp. DWC6 菌株在液体 LB 培养基中于 18℃ 培养 24h 后,于 4℃ 8000r/min 离心收集处于对数生长后期的菌体,利用 Blood & Cell Culture DNA Kit (QIAGEN, Germany) 抽提菌体染色体 DNA,并以限制性内切酶 *Sau* 3A I 部分酶切染色体 DNA,酶切产物通过 1.5% 的琼脂糖凝胶进行分离,回收 100 到 1000bp 大小的 DNA 片段,并与经 *Bam* H I 酶切、去磷酸化处理的 pBAP1 载体连接。连接产物电转化 *E. coli* JM109,并在终浓度为 40 μ g/mL 的 Km LB 固体平板上于 37℃ 培养筛选转化子。经平板菌

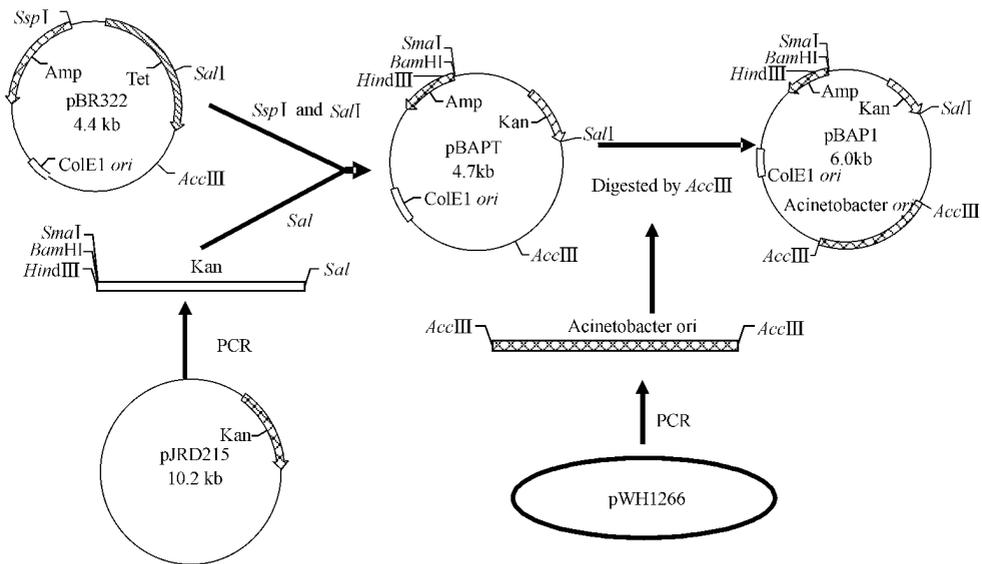


图1 *Acinetobacter* sp. DWC6 启动子探针载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of construction of a promoter probe vector for *Acinetobacter* sp. DWC6

落计数估算出有效的基因组文库覆盖率后,将平板上长出的所有克隆转至 10mL 新鲜的 LB 液体培养基中(含 40 μ g/mL Km),于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 4 h 后收集菌体,用 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) 提取质粒,以 0.5 μ g 质粒电转化 *Acinetobacter* sp. DWC6,转化子在终浓度为 20 μ g/mL Amp 的 LB 固体平板上于 18 $^{\circ}$ C 培养至少 48h,筛选到的阳性克隆影印到终浓度分别为 20, 200, 500, 1000, 2000 和 3000 μ g/mL Amp 的 LB 固体平板上,于 18 $^{\circ}$ C 培养 4d。将能在 3000 μ g/mL Amp 平板上生长的克隆转接到终浓度为 500 μ g/mL Amp 的液体 LB 培养基中摇瓶培养,观察细胞生长状况并进一步检测报告基因 β -内酰胺酶的表达水平。

1.5 β -内酰胺酶的酶活力检测方法

选取对氨苄青霉素(Amp)有强抗性的 *Acinetobacter* sp. DWC6 转化子,接种在终浓度为 40 μ g/mL Km 的 LB 液体培养基中,并分别在 7 $^{\circ}$ C, 15 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C 进行摇瓶培养,至对数生长期后期时收集培养液,测定不同温度下培养液中分泌蛋白的 β -内酰胺酶活性。酶活力检测方法:以 100 μ mol/L nitrocefin 为底物,在 50mmol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)中检测 β -内酰胺酶活性,利用 Beckman DU640 分光光度计,测定 A_{482} 的吸光度进行检测,产物的消光系数 15000L/(mol \cdot cm),以 1min 内催化生成 1 μ mol 产物所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.6 蛋白浓度的测定

以牛血清白蛋白作为标准蛋白,利用 Bradford 分析试剂(Nacalai Tesque, Inc, Kyoto, Japan)测定培

养液中蛋白浓度。

1.7 SDS-PAGE 检测 β -内酰胺酶表达水平

Acinetobacter sp. DWC6 转化子在终浓度为 40 μ g/mL Km 的 LB 培养基中于 15 $^{\circ}$ C 培养 24h 后,收集培养上清液并通过 Amicon MWCO 10000 (Millipore, USA) 超滤浓缩培养液中的分泌蛋白 100 倍,每个泳道上样 20 μ L 浓缩样品(约含 16 μ g 蛋白),进行 SDS-PAGE 分析。利用 NIH Image software (1.62 version) 定量分析 β -内酰胺酶表达量。

2 结果

2.1 启动子探针质粒的构建

启动子探针质粒 pBAP1 依据图 1 所示流程构建。构建的启动子探针载体 pBAP1 能在 *E. coli* 和 *Acinetobacter* sp. DWC6 中正常复制和增殖。

2.2 启动子的筛选

用限制性内切酶 *Sau*3A I 部分酶切 *Acinetobacter* sp. DWC6 基因组 DNA,回收 100 到 1000 bp 大小的 DNA 片段,并与经 *Bam*H I 酶切、去磷酸化处理的 pBAP1 载体连接,电转化 *E. coli* JM109 构建成启动子筛选文库。该文库包含 30000 个克隆,均具有 Km 抗性,经计算该基因组文库覆盖率为 99.9%。纯化 *E. coli* 转化子质粒并电转化 *Acinetobacter* sp. DWC6,筛选到 260 个具有 Amp 抗性的克隆。将所有 Amp 抗性克隆在终浓度为 100、200、500、1000、2000 和 3000 μ g/mL Amp 的 LB 平板上进行筛选培养,几乎所有克隆均可在 100 μ g/mL Amp 的 LB 中生长,约 3/5 的转化子能在 500 μ g/mL Amp

的 LB 中生长, 7 个克隆能在高于 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 中生长。经限制性内切酶图谱分析, 将 7 个克隆中插入片段相同的克隆合并后, 最后形成 3 个目的克隆片段, 命名为片段 P1、P3 和 P6。将 *Acinetobacter* sp. DWC6 转化子中的质粒纯化后重新导入 *E. coli* 中, 所有 *E. coli* 转化子无论在液体还是固体培养基中均具有 Amp 抗性, 获得启动子序号为 P1、P3、P6。

2.3 不同转化子的 β -内酰胺酶的表达水平比较

在不同温度下, 分别培养携带不同启动子质粒 *Acinetobacter* sp. DWC6, 表达的 β -内酰胺酶活性见图 2, 其中带有 pP3 质粒的转化子酶活最高, 达 91u/mg, 同时表明 β -内酰胺酶的表达量与温度具有正相关性, 在 7 $^{\circ}\text{C}$ ~ 15 $^{\circ}\text{C}$ 之间 (*Acinetobacter* sp. DWC6 的最适生长温度为 15 $^{\circ}\text{C}$), 随着培养温度的降低, β -内酰胺酶的表达量逐渐升高。其中 P3 的表现最为明显, 可以初步判断 P3 为一个低温强启动子。

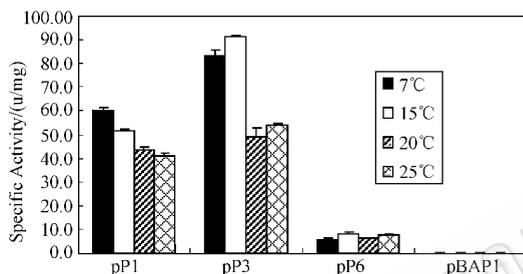


图 2 不同温度下携带不同启动子质粒的转化子 β -内酰胺酶活性比较

Fig. 2 The β -lactamase activity of *Acinetobacter* sp. DWC6 transformants grown at various temperatures.

2.4 不同转化子 β -内酰胺酶的表达量分析

对质粒 pBAPT, pBAP1 和含启动子 P1、P3、P6 片段的质粒 pP1、pP3 和 pP6 转化子进行 β -内酰胺酶表达水平的研究表明, 只有经 pP1 和 pP3 转化的 *Acinetobacter* sp. DWC6 能产生可以通过 SDS-PAGE 检测到的 β -内酰胺酶条带, 分子量约为 29kD, 利用软件 NIH Image 定量分析 β -内酰胺酶表达水平表明它们的表达量分别达到了胞外总蛋白的 34% 和 56% (图 3)。

3 讨论

启动子是基因表达调控的重要元件和蛋白表达载体质粒的重要组成部分, 因此分离出具有高效启动功能的启动子成为基因工程研究不可缺少的工作^[9, 10], 常见的启动子有 trp 启动子、lac 启动子和 T7 启动子等。分离启动子的方法很多, 常用的方法有构建启动子探针载体筛选启动子和 PCR 法的克隆启动子^[11, 12]。构建启动子探针载体是一种高效分

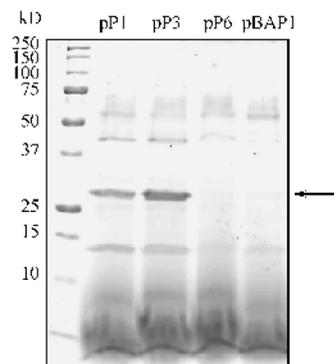


图 3 SDS-PAGE 分析不同转化子 β -内酰胺酶的表达量(箭头所示条带为 β -lactamase)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of β -lactamase produced by *Acinetobacter* sp. DWC6 harboring various plasmids

离启动子的方法, 在启动子分离中被广泛采用。

目前, 以低温菌为宿主细胞、利用来源于低温菌的启动子构建低温蛋白表达系统已经获得成功^[13, 14], 并在低温下高效地表达了常温蛋白表达系统所难以表达的蛋白^[15], 包括来源于常温菌的甲苯、二甲苯单加氧酶^[16], 来源于人类的神经生长因子^[17]。在低温蛋白表达系统表达的神经生长因子不但没有形成包涵体, 而且准确定位于细胞的周质空间, 充分体现了低温蛋白表达系统的优越性, 为异源低温蛋白和常温蛋白的高效表达提供了新的有效方法^[17]。

本研究构建的启动子探针质粒 pBAP1 能在常温菌 *E. coli* 和低温菌 *Acinetobacter* sp. DWC 6 中正常复制。质粒以 β -lactamase 为报告基因, 报告基因上游易于插入含待筛选启动子的 DNA 片段, 通过检测 β -lactamase 的表达水平, 可以分析 DNA 片段中启动子存在及其活性, 具备了启动子探针载体的主要功能。本研究还利用此探针质粒, 筛选获得了高活性的低温启动子 DNA 片段, 为进一步构建低温蛋白表达系统及研究低温蛋白的表达调控机制打下了坚实的基础。

致谢 本研究部分工作在日本京都大学化学研究所完成, 谨向该研究所的江琦信方及栗原教授表示感谢!

REFERENCES (参考文献)

- [1] Feller G, Zekhnini Z, Lamotte-Brasseur J, et al. Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur J Biochem*, 1997, **244**(1): 186 - 191.
- [2] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2000, **18**

- [3] Russell NJ. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria : potential applications. *Adv Bioch Eng Biotech* , 1997 , **61** :1 – 21.
- [4] Gounot AM. Bacterial life at low temperature : physiological aspects and biotechnological implications. *J Appl Bacterio* , 1991 , **71**(5) : 386 – 397.
- [5] Margesin R , Schinner F. Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil. *Appl Microbiol Biotechno* , 1998 , **49**(4) :482 – 486.
- [6] Papa R , Rippa V , Sannia G , *et al.* An effective cold inducible expression system developed in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *J Biotechnol* , 2007 , **127**(2) :199 – 210.
- [7] Jeon YH , Negishi T , Shirakawa M , *et al.* Solution structure of the activator contact domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Science* . 1995 , **270**(5241) :1495 – 1497.
- [8] Suzuki T , Nakayama T , Kurihara T , *et al.* Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J Biosci Bioeng* , 2001 , **92**(2) :144 – 148.
- [9] Sun XH(孙晓红) , Chen MJ(陈明节) , Pan YJ(潘迎捷) . A brief account of promoter cloning. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报) , 2002 , **9**(3) :57 – 62.
- [10] Li SS(李姗姗) , Chi Y(迟彦) , Li LF(李凌飞) , *et al.* Progress on cloning of promoter. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志) , 2005 , **25**(7) :9 – 16.
- [11] Wang XG(王新国) , Xiao CZ(肖成祖) , Zhang GH(张国华) , *et al.* Isolation of a Novel Carrot Invertase II Promoter by Adaptor-PCR. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报) 2001 , **17**(1) :61 – 65.
- [12] Su N(苏宁) , Sun M(孙萌) , Li YN(李轶女) , *et al.* Isolation and Modification of Rice Chloroplast 16S Promoter , Construction of Expression Vector and Transformation. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报) 2003 , **20**(3) :295 – 301.
- [13] Birolo L , Tutino ML , Fontanella B , *et al.* Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Cloning , expression , properties , and molecular modelling. *Eur. J. Biochem.* 2000 , **267**(9) :2790 – 2802.
- [14] Duilio A , Madonna S , Tutino ML , *et al.* Promoters from a cold-adapted bacterium : definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements. *Extremophiles* , 2004a , **8**(2) :125 – 132.
- [15] Duilio A , Tutino ML , Marino G , *et al.* Recombinant protein production in antarctic Gram-negative bacteria in recombinant gene expression. *Methods Mol Biol* , 2004b , **267** :225 – 237.
- [16] Siani L , Papa R , Di Donato A , *et al.* Recombinant expression of Toluene *o*-Xylene Monooxygenase (ToMO) from *Pseudomonas stutzeri* OX1 in the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *J Biotechnol* . 2006 , **126**(3) :334 – 341.
- [17] Vigentini I , Merico A , Tutino ML , *et al.* Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis* . *J Biotechnol* , 2006 , **127**(1) :141 – 150.