

巨大芽孢杆菌青霉素G酰化酶基因的克隆和表达

张兰芳¹ 李忠伟² 张其玖¹

(中国科学院生物物理研究所, 北京)¹

(中国科学院应用生态研究所, 沈阳)²

我们分离到了一株产生分泌型青霉素G酰化酶的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* BM1)。用pBR322作载体, 将该菌的青霉素G酰化酶基因克隆到大肠杆菌 (*Escherichia coli* MC1061)中, 得到含有9.9kb插入片段的重组质粒 pBmPA4。分析了该质粒的限制酶酶切图谱, 并经体外缺失获得含4.9kb插入片段的质粒pBmPA5。pBmPA4 和 pBmPA5 在*E. coli* MC1061中均能表达, 表达受苯乙酸诱导。

关键词 青霉素G酰化酶; 基因克隆; 表达; 巨大芽孢杆菌

在产生青霉素G酰化酶的众多微生物中, 研究和工业应用最多的是大肠杆菌和巨大芽孢杆菌^[1]。其中巨大芽孢杆菌能将青霉素G酰化酶(PGA)分泌到细胞外^[2], 这种特性对酶的工业化提取十分有利。建立高产和分泌型的PGA酶产生菌是一个重要课题。国际上, 有关巨大芽孢杆菌PGA的工业生产及研究常用的菌株是A TCC14945及其衍生株, 但关于其PGA酶的遗传分析却报道不多。McCullough^[2]曾从ATCC14945的高产突变株SC3593中克隆到一个2.7kb的DNA片段, 能够使PGA的产量提高, 但没有获得PGA的结构基因。Meevootisom等^[3]首次报道成功地克隆到ATCC14945突变株的PGA结构基因, 但是克隆的基因在*E. coli*中表达十分微弱, 且检测不到分泌到细胞外的酶活性。我们分离到了一株产生分泌型PGA酶的*B. megaterium* BM1, 本文介绍该菌株PGA基因的克隆及在*E. coli*中的表达。

材料和 方法

(一)细菌和质粒

所用的细菌和质粒列于表1

(二)培养基及化学药品

*E. coli*及*B. megaterium*的常用培养基为LB和TYB培养基^[4]。2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸(NIPAB)购自上海东风试剂厂。DNA限制酶、T4DNA连接酶等从美国Biolabs和西德Boehringer Mannheim公司购进, 细菌磷酸单酯酶, 溶菌酶、琼脂糖等为中国科学院生物物理研究所生化厂产品。其他化学试剂均系市销分析纯。

(三)DNA的操作

B. megaterium BMI染色体DNA的制备基本上参考文献[5]的方法进行, 所得DNA制品经过RNaseA和RNaseT1水解, 再经Sepharose4B柱层析分离, 得纯净的DNA。质粒DNA的制备按照Maniatis等^[6]的方法, 大量提取采用CsCl梯度超离心法, 小量提取采用SDS-NaOH裂解法。DNA酶切片段的分离与收集采用

本文于1989年5月15日收到。

中国科学院微生物研究所蔡妙英同志协助鉴定了*Bacillus megaterium* BMI菌株, 在此致谢。

表 1 细菌和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids used

细 菌 Bacteria	基 因 型 Genotype	来 源 或 参 考 Source or Refs.
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , hsdS20(r ⁻ B, m ⁻ B), rccA13, ara-I 4, proA2, lacYI, galK2, rpsL20(Sm ^r), xy1-5, mtl-1, supE44, λ ⁻	(6)
<i>E. coli</i> MC1060	araD139 Δ(ara, leu)7697, Δ(lacIPOZYA X74, galU ⁻ , galk ⁻ , hsr ⁻ , hsm ⁺ , strA	(6)
<i>B. megaterium</i> BM1	PGA producer	本研究 This work
质 粒 Plasmids		
pBR322	tet ^r , amp ^r , ColEI复制子 ColEI replicon	
pWR1 3	amp ^r , ColEI 复制子 ColEI replicon	(10)
pPGA20	amp ^r , in pWR13	(4)
pBmP A 4	tet ^r , amp ^r , 9.9 kb的 <i>B. megaterium</i> BMI PGA基因克隆在pBR322上 pBR322 with 9.9 kb insert containing <i>B. megaterium</i> BMI PGA gene	本研究 This work
pBmP A 5	amp ^r , 4.9kb的 <i>B. megaterium</i> BMI PGA基因克隆在pWR1 3 上pWR1 3 with 4.9 kb insert containing <i>B. megaterium</i> BMI PGA gene	本研究 This work

低熔点琼脂糖凝胶电泳法^[6]。限制酶酶切、脱磷、连接、转化细胞的制备和质粒DNA的转化等均按Maniatis^[6]的方法。

(四)青霉素G酰化酶基因克隆的筛选
采用NIPAB试纸法^[7]阳性菌落直接从试纸上挑出。

(五)青霉素G酰化酶活性的测定
PGA的定量测定,以NIPAB为底物,基本上按文献[8]进行。

结 果

(一)*B. megaterium* BM1青霉素G酰化酶基因的克隆

产青霉素G酰化酶菌株为革兰氏阳性产芽孢杆菌,大小为1.2—1.5×2.0—5.0μm,严格好气生产,水解淀粉和酪素,接触酶阳性,对溶菌酶敏感,卵黄反

应和V-P试验阴性,属于典型的*B. megaterium*菌株^[9]。

B. megaterium BM1的青霉素G酰化酶基因克隆的程序如图1所示。染色体DNA经EcoRI部分水解,pBR322 DNA用EcoRI完全降解后再用BAP脱去末端磷酸基团,降解的染色体与载体DNA经T4DNA连接酶连接后转化*E. coli* MC1061,涂布在含有50μg/ml的氨苄青霉素的TYB琼脂培养基上。用NIPAB试纸法在大约2000个转化子中筛选到1个PGA阳性菌落。为使该克隆纯化,从这个阳性菌落中分离出质粒DNA,再转化到*E. coli* HB101中,挑取NIPAB阳性反应的单菌落,因此得到含PGA基因的克隆pBmPA4。小量提取的质粒经EcoRI降解表明,插入DNA含有2.1kb+7.8kb两个EcoRI片段,总长为9.9kb。

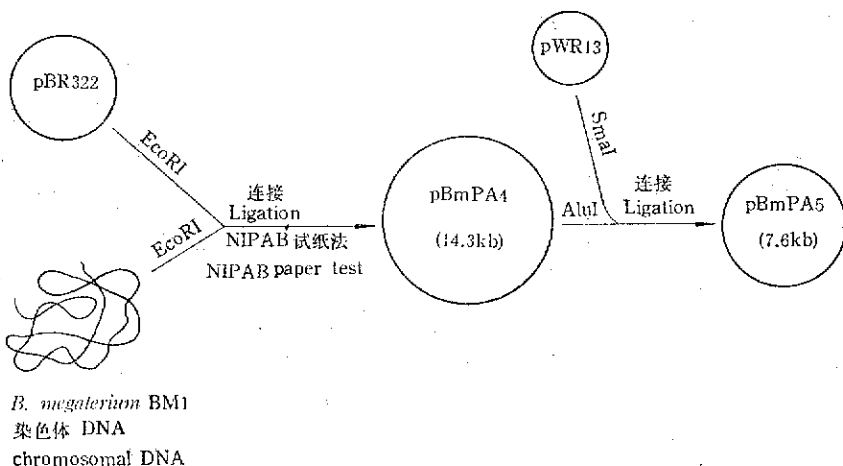


图 1 *B. megaterium* BM1 青霉素 G 酰化酶基因的克隆程序
Fig. 1 Cloning procedure of penicillin G acylase gene from *B. megaterium* BM1

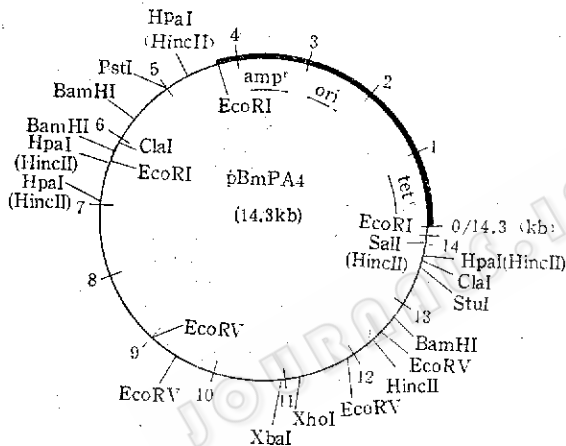


图 2 pBmPA 4 的限制酶酶切图谱
Fig. 2 Restriction map of pBmPA 4

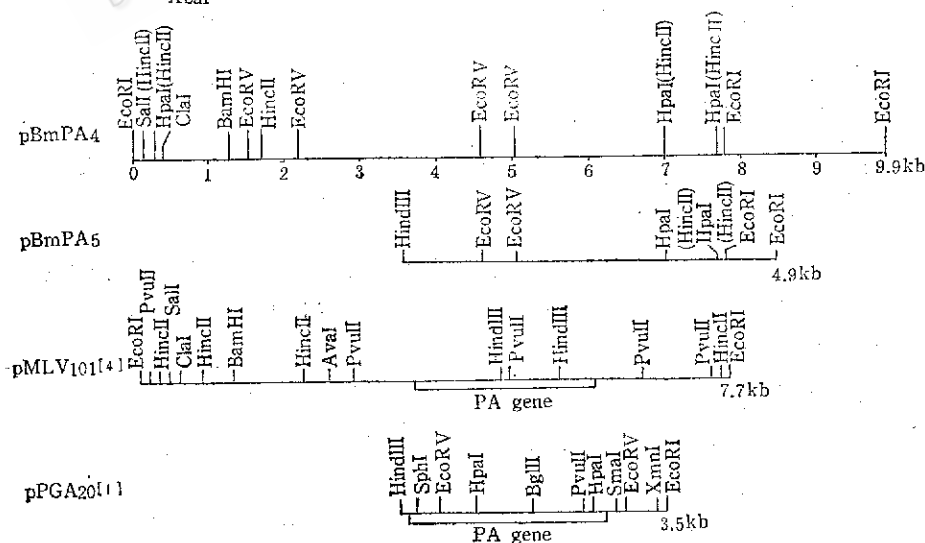


图 3 不同来源的青霉素 G 酰化酶基因克隆限制酶酶切图谱的比较
Fig. 3 Comparison of restriction maps of penicillin G acylase gene clones from different sources

(二)pBmPA4的限制酶酶切图谱及体外缺失

用CsCl梯度超离心制备的pBmPA4 DNA进行限制酶酶切,酶切片段经琼脂糖凝胶电泳后测量大小(图版1)。分析不同的酶切结果得到的酶切图谱见图2。除图中标出的酶切位点之外,还试验了以下几种酶(括号内为在插入DNA上的切点数): HindⅢ(6), PvuⅡ(4), XmnⅠ(4), StyⅠ(3), DraⅠ(5), SphⅠ(5), NruⅠ(0), NcoⅠ(0), KpnⅠ(0), SmaⅠ(0), MluⅠ(0), BglⅡ(0)。以上的酶切图谱与*B. megaterium* UN1的克隆pMLV101相近^[3],但是HincⅡ的位点有不同;与来自*E. coli* AS1,76的PGA基因克隆pPGA20^[4]相比有很大差别(图3)。

用AluⅠ部分降解pBmPA4 DNA,收集3—5 kb的片段,与经SmaⅠ降解后脱磷的pWR13连接,转化*E. coli* MC1061,筛选到1个NIPAB阳性克隆pBmPA5,它含有4.9kb的插入片段(图3)。pBmPA5在*E. coli*中能表达产生PGA酶活力,可以认为它含有完整的PGA结构基因。

(三)*B. megaterium* BM1及其重组基因的表达

B. megaterium BM1和*E. coli* MC1061用TYB培养基,所有克隆质粒均转化入*E. coli* MC1061以获得相同的背景,并在TYB中加入氨基青霉素(终浓度50μg/ml)作选择压力,在28℃振荡培养。活性测定见表2。

培养6h,所有的菌株和重组质粒均检

表2 *B. megaterium* BM1菌株及克隆株产生青霉素G酰化酶的活性*
Table 2 Activities of penicillin acylases in *B. megaterium* BM1 and clones*

菌 株 Strain	培养 24h 活性 Activities in 24h culture			培养 48h 活性 Activities in 48h culture		
	总活性 Total activity	培养物上清液活性 Cell-free medium	分泌率 Secretion rate(%)	总活性 Total activity	培养物上清液活性 Cell-free medium	分泌率 Secretion rate(%)
<i>B. megaterium</i> BM1	0.7	0.6	85.7	33.3	23.2	69.7
<i>E. coli</i> MC1061(pBmPA4)	34.0	8.3	24.4	58.4	20.5	35.1
<i>E. coli</i> MC1061(pBmPA5)	33.5	11.5	34.3	73.8	26.7	36.2
<i>E. coli</i> MC1061(pPGA20)	31.4	2.9	9.2	42.0	8.6	20.5
<i>E. coli</i> MC1061	0.0	0.0	--	0.0	0.0	--

* 表中列出的数据是100ml培养物的酶活单位数
Data shown in this table are enzyme units in 100ml culture

测不到PGA活性(数据未列出);至24h,*B. megaterium* BM1表现出很弱的活性,而克隆的基因表达较高;培养48h后,*B. megaterium* BM1酶活性才显著,pBmPA4和pBmPA5酶活性上升一倍左右,而pBmPA5酶活性更高,比出发菌株的活力高出一倍多。pPGA20在24h的酶活性与pBmPA4和pBmPA5相近,在48h酶活性有所升高,但显著低于pBmPA4和

pBmPA5。*E. coli* MC1061作为负对照,在培养过程中始终无酶活性。

从表2还可看出培养物离心上清液的PGA酶活性的情况。*B. megaterium* BM1细胞上清液酶活性占三分之二以上,pBmPA4和pBmPA5细胞上清液酶活性占三分之一以上,而pPGA20细胞外酶活性较少。重组质粒在培养48h比培养24h细胞上清液酶活性比率略有增加。pBmPA5

与pBmPA4相比, 细胞上清液酶活性的比率并无显著差别。

此外我们还测定了苯乙酸对酶活性的诱导情况, 结果见表3。加与不加PAA对*B. megaterium* BM1活性影响较小, 对

pPGA20影响大些, pBmPA4和 pBmPA5对PAA的反应在前两者之间。随着培养时间的延长, *B. megaterium* BM1, pBmPA4和 pBmPA5的诱导率有上升的趋势。

表3 苯乙酸对*B. megaterium* BM1及克隆株产pA酶的诱导作用*

Table 3 PAA induction on penicillin acylase production by *B. megaterium* BM1 and clones*

菌株 Strain	培养 24h 活性 Activities in 24h culture			培养 48h 活性 Activities in 48h culture		
	不诱导** Uninduced	诱导 Induced	诱导率 Induction rate(%)	不诱导 Uninduced	诱导 Induced	诱导率 Induction rate(%)
<i>B. megaterium</i> BM 1	0.8	0.7	0.0	22.2	33.3	33.3
<i>E. coli</i> MC1061(pBmPA4)	24.5	34.0	27.9	31.4	58.4	46.2
<i>E. coli</i> MC1061(pBmPA5)	25.5	33.5	23.9	44.1	73.8	40.3
<i>E. coli</i> MC1061(pPGA20)	12.0	31.4	61.8	13.5	42.0	67.9
<i>E. coli</i> MC1061	0.0	0.0	--	0.0	0.0	--

* 培养条件同表2, 表中数据为每100ml培养物中酶单位数

Culture conditions are the same as in Table 2. Data shown are enzyme units in 100ml culture

** 不诱导指不加苯乙酸, 诱导指加入0.15%苯乙酸。诱导率 = $\frac{\text{诱导活性} - \text{不诱导活性}}{\text{诱导活性}} \times 100\%$

Uninduced and induced mean that 0.15% PAA is omitted from or added to the culture medium; Induction rate = $\frac{\text{Induced} - \text{Uninduced}}{\text{Induced}} \times 100\%$

表4 不同*B. megaterium* 青霉素G酰化酶基因克隆表达的比较

Table 4 Comparison of expression of cloned PA genes from different *B. megaterium* strains

作者 Author	克隆DNA Cloned DNA (kb)	载体质粒 Plasmid vector	宿主 Host strain	表达 Expression	酶活增加量 Increase in enzyme activity(%)
McCullough, J. E.	2.7	pPL608	<i>B. megaterium</i> SC3593	0	20.0
Meevootisom, D. et al.	7.7	pACYC184	<i>E. coli</i> DH1	+	显著降低 Significantly lower
本研究 This work	9.9	pBR322	<i>E. coli</i> MC1061	++++	75.0
	4.9	pWR13	<i>E. coli</i> MC1061	++++	122.0

表4比较了不同克隆株及其表达的实验结果。由于pBmPA5是从pBmPA4插入片段的两端造成的缺失, 故结构基因定位在pBmPA4的中部, 这与pMLV101可成对照(图3)。因此, pBmPA4在*E. coli*中的表达很可能使用的是PGA基因自身的启动子。pBmPA5在48h表达比pBmPA4高, 这可能是由于较小的质

粒具有较多拷贝数的缘故。pPGA20已被证明是能够活跃表达的*E. coli* PGA基因克隆^[11], 然而在相同宿主细胞中, pBmPA4和pBmPA5表达的并不低于pPGA20, 这可能说明*B. megaterium* BM1 PGA基因的启动子在*E. coli*中可以有效地起作用。

pBmPA4和pBmPA5在培养物上清

液中的PGA酶活性比分泌型出发菌株 *B. megaterium* BM1要低,但是却比不能分泌的对照pPGA20要高。培养物上清液中酶活性可能部分地由于培养后期细胞自溶而产生。

Meevootisom等报道的pMLV101在 *E. coli*中不能有效地表达,且不能将PGA酶分泌到细胞外,他们认为可能由于该基因的启动子较弱或载体启动子的转录通读(transcriptional readthrough)较差,也许是转译后加工造成酶活性降低和不能分泌。pBmPA4和 pBmPA5与上述这些推论似乎不能一致。而我们用的宿主是MC1061而不是DH1,是否由于宿主细胞基因型不同而造成这种差异。此外,尽管pBmPA4与 pMLV101在酶切图谱上相近,但仍有一定的差别,这可能与

*B. megaterium*出发菌株不同有关。

Meevootisom等报道以 Tn1000诱变来绘制pMLV101 PGA酶的基因大小和酶切图谱,我们以体外酶切作出了pBmPA4的克隆DNA片段的酶切图谱,两者方法不同,但结果十分接近。但与来自 *E. coli*的pPGA20的酶切图谱找不到共同性。这很可能是进化过程造成的差异。DNA定序工作可望揭示这些PGA基因以及其他来源的PGA基因之间的亲缘关系。

B. megaterium BM1的PGA基因克隆在 *E. coli*中表达出较高的酶活性,这在工业化应用方面很有潜力。有关 *B. megaterium* BM1青霉素G酰化酶的克隆株的进一步表达及结构分析工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Shewale, J. G. et al.: *Process Biochemistry*, 24:146—154, 1989.
- [2] McCullough, J. E.: *Bio/Technology*, 1:879—882, 1983.
- [3] Meevootisom, D. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25:372—378, 1987.
- [4] 张其玖等: *微生物学报*, 28(1):40—44, 1988.
- [5] 敖世洲等: *遗传学报*, 10:85—90, 1983.
- [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1982.
- [7] Zhang, Q. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 156:413—416, 1986.
- [8] 张启先等: *微生物学报*, 19:302—308, 1979.
- [9] 蔡妙英等译: *芽孢杆菌属*, 农业出版社, 北京, 1983.
- [10] 郭礼和等: *生物工程学报*, 1:14—33, 1985.
- [11] Zhang, Q. J. et al.: *Biotechnology letters*, 12:493—497, 1990.

Cloning and Expression of Penicillin G Acylase Gene from *Bacillus megaterium* Strain BM1

Zhang Lanfang¹ Li Zhongwei² Zhang Qijiu¹

(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences Beijing)¹

(Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang)²

A strain of *Bacillus megaterium* (designated BM1) that produces penicillin G acylase secretorily has been isolated and identified. Its structural gene has been cloned in *E. coli* MC1061 using the vector pBR322. A penicillin G acylase positive clone, pBmPA4, was screened out by the NIPAB test paper method. The cloned DNA fragment is 9.9 kb made of two (2.1kb+7.8kb) EcoRI fragments, and its restriction map has been established. A clone pBmPA5, containing 4.9 kb inserted DNA in the vector pWR13, has been developed by *in vitro* deleting pBmPA4. pBmPA5 still contains the full length of penicillin G acylase gene. Both pBmPA4 and pBmPA5 strains can express penicillin G acylase genes in the host strain *E. coli* MC1061. Penicillin G acylase produced by the clone strains is under the induction of phenylacetic acid

Key words

Penicillin G acylase; gene cloning; expression; *Bacillus megaterium*

Zhang Lanfang et al.: Cloning and expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* strain BM1



pBmPA4DNA的限制酶酶切电泳图，分子量标记是经EcoRI降解的SppI DNA

1—3. Agarose gel electrophoresis of pBmPA4 DNA digested with different restriction endonucleases. Molecular weight markers are EcoRI digested SppI DNA.