

嗜麦芽假单胞菌的碱性蛋白酶基因 在大肠杆菌中的克隆与表达

江盛梅 沈萍 彭珍荣

(武汉大学生物学系, 武汉 430072)

用pUC18质粒作为载体, 将嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia* P27)的碱性蛋白酶基因克隆到大肠杆菌(*E. coli* TGI)中, 得到3株能分泌碱性蛋白酶的阳性克隆G1, G2和G3。其中G3所分泌的碱性蛋白酶活性最高, 大约是出发菌株的3-4倍, 对3株阳性克隆所含的重组质粒pSJ1, pSJ2和pSJ3进行限制酶酶切分析表明, 酶活最高的阳性克隆G3所含的重组质粒pSJ3的插入片段最小, 大约是2.8kb; 其它两株的重组质粒pSJ1和pSJ2含有同样大小的插入片段, 约为5.5kb。

关键词 碱性蛋白酶; 基因克隆和表达; 嗜麦芽假单胞菌

碱性蛋白酶是一种重要的工业用酶^[1-3], 迄今为止, 用于工业生产的碱性蛋白酶产生菌均为芽孢杆菌, 非芽孢菌产生的碱性蛋白酶由于产量低而不能用于生产, 但是这类蛋白酶制剂不仅无芽孢污染而且在低温洗涤及肿瘤防治方面有很大的应用潜力^[4,5], 因此提高这类菌的产酶能力有重要的应用价值。嗜麦芽假单胞菌是一类革兰氏阴性细菌, 能够产生包括碱性蛋白酶在内的多种有用代谢产物^[6-9]。我们通过诱变的方法已获得酶活比原始菌株高两倍的嗜麦芽假单胞菌P27^[10]。本文报道嗜麦芽假单胞菌P27碱性蛋白酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达。

材料和方 法

(一) 细菌菌株和质粒

大肠杆菌TGI, 由中国科学院武汉病毒研究所赠送; 嗜麦芽假单胞菌P27由本室获得。本实验中所用的质粒载体pUC18, 由华美生物技术公司购买。

(二) 培养基

本实验用的标准培养基为LB培养基(%) : 蛋白胨1, 酵母浸膏0.3, NaCl 0.5, pH7.2。固体培养基添加1.2克琼脂粉。

(三) 酶和试剂

限制酶、T4连接酶、X-gal、氯霉素、CTAB以及氨苄青霉素均从华美生物技术公司购买; RNase, 蛋白酶K从Sigma化学公司购买。

(四) 细菌染色体DNA的制备

按Ausubel等^[11]描述的方法将嗜麦芽假单胞菌单个菌落接种于5ml LB培养液中, 28℃振荡培养24h, 离心(12000 r/min, 2min), 将细胞沉淀悬浮于1.7ml TE缓冲液中(1mmol/L Tris-HCl 0.1 mmol/L EDTA), 加入10% SDS 90 μ l和20mg/ml蛋白酶K9 μ l, 混匀后置37℃保温1h, 加入5mol/L NaCl 300 μ l, 充分混匀, 再加入240 μ l 10% CTAB溶液(溶于0.7mol/L NaCl中)混匀, 置65℃水浴

本文于1991年11月5日收到。

10min,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀,离心(12000r/min,5min),取上层水相用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)充分抽提,取出上层水相加0.6倍体积的异丙醇沉淀DNA,并用70%乙醇淋洗DNA两次,真空干燥后溶于300 μ l TE缓冲液中,置-20 $^{\circ}$ C贮存。

(五) 质粒载体的制备

用氯霉素(终浓度达170 μ g/ml)扩增质粒以后,按Humphreys等描述的方法^[11]制备大量质粒DNA;小量质粒DNA的制备按Close和Rodriguez^[13]的方法。所有制备的DNA溶液在用酚-氯仿抽提以后,在使用或贮存之前均按Maniatis等^[14]描述的方法用酒精进行沉淀。

(六) 连接和转化

按Maniatis等^[14]描述的方法将提纯的染色体DNA分别用EcoRI, BamHI和SalI进行部分消化;质粒pUC18 DNA分别用同样的酶进行完全消化以后,在14—18 $^{\circ}$ C进行连接反应18h左右,然后将40 μ l连接反应物加到200 μ l *E. coli* TGI的感受态细胞悬液中,混匀,冰浴30—40min,42 $^{\circ}$ C热处理3—4min,再次冰浴1—2min,加入等体积的2倍浓度的LB培养基,37 $^{\circ}$ C保温1h。

(七) 碱性蛋白酶阳性克隆的筛选

取上述转化菌悬液20 μ l涂布于含有IPTGX-gal(终浓度分别为40 μ g/ml)和氨苄青霉素(170 μ g/ml)的LB平板上,置28 $^{\circ}$ C培养24—48h后,将长有菌落的平板置4 $^{\circ}$ C数小时。用消毒牙签挑取白色菌落点种到含有下列成份的蛋白酶检测平板上(%) : 蛋白胨1, 酪蛋白0.5, 葡萄糖0.1, NaCl 0.5, CaCl₂ 0.01, 琼脂粉1.5, pH7.4。置30 $^{\circ}$ C培养24—48h,按彭珍荣等描述的方法^[15]检测阳性克隆^[15]。

(八) 碱性蛋白酶活性试验

将上述获得的阳性克隆分别培养在含有下列成份的液体培养基中(%) : (NH₄)₂SO₄ 0.5, K₂HPO₄ 2.0, KH₂PO₄ 1.5, CaCl₂ 0.025, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 0.1, 蛋白胨0.1, 水解酪蛋白0.1, 葡萄糖2, 玉米粉1, 黄豆饼粉1, 微量元素〔微量元素溶液(%) : EDTA 0.5, CaCl₂·6H₂O 0.016, ZnSO₄·7H₂O 0.22, CuSO₄·5H₂O 0.0175, MnSO₄·4H₂O 0.05, Na₂MnO₄·2H₂O 0.015, FeSO₄·7H₂O 0.05, pH6.0〕3ml, 氨苄青霉素170 μ g/ml, pH7.0。振荡培养66h,离心。取上清并按Folin法^[16]测定碱性蛋白酶活性。

结果与讨论

(一) 嗜麦芽假单胞菌碱性蛋白酶基因的克隆

嗜麦芽假单胞菌P27的染色体DNA分别用EcoRI, BamHI和SalI部分消化并与pUC18质粒DNA(用同样的酶分别进行完全消化)进行连接并转移至大肠杆菌TGI后,在含有IPTG, X-gal和氨苄青霉素的LB平板上筛选菌落呈无色的重组转化子。转化的实验结果表明,上述3种酶切后的连接物转化至大肠杆菌TGI后均能得到高频率的无色转化子。分析其中15000个转化子,获得了3株能产生碱性蛋白酶的阳性克隆G1, G2和G3,而且这3株阳性克隆均来自用EcoRI消化嗜麦芽假单胞菌染色体DNA所获得的转化子(图1, 2)。

(二) 阳性克隆插入片段的大小

为了确定所获得的3株阳性克隆插入DNA片段的大小,我们分别对这3株阳性克隆所含的重组质粒pSJ1, pSJ2和pSJ3分离提纯后,用EcoRI进行消化和琼

1 2 3 4 5 6 7 8

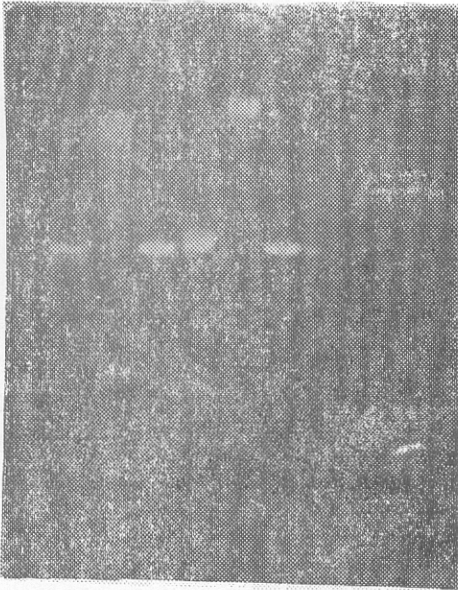


图 1 嗜麦芽假单胞菌 P27 的染色体 DNA 和 pUC18 质粒 DNA 的限制酶酶切结果

Fig.1 Restriction digest patterns of chromosomal DNA from *P.maltophilia* P27 and plasmid pUC18

1, 3, 4, 6. pUC18 was digested with EcoRI, BamHI, SalI and PstI, respectively; 2. Chromosomal DNA was partially digested with EcoRI, 5. Undigested chromosomal DNA, 7. Chromosomal DNA was partially digested with BamHI, 3. Chromosomal DNA was partially digested with SalI

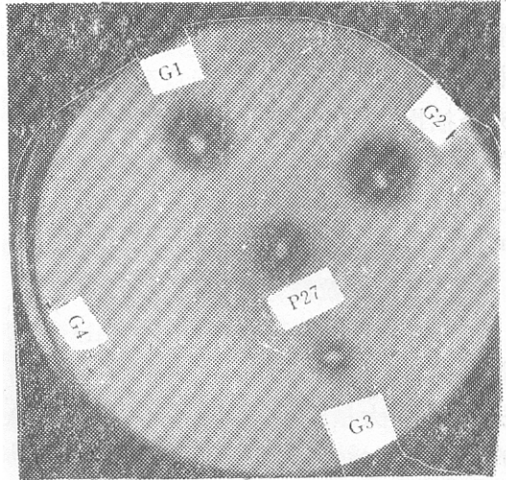


图 2 生长在蛋白酶检测平板上的阳性克隆

Fig.2 Positive clones grew on plate detecting alkaline protease

G1, G2 and G3 were positive clones G4 was negative contrast

表 1 出发菌株和阳性克隆的碱性蛋白酶活性比较

Table 1 The comparison on activities of alkaline protease in original strain and positive clones

Strain	Alkaline protease activities(μg/ml)	Size of inserted DNA in recombinant plasmid (kb)
<i>P.maltophilia</i> P27	331	—
<i>E.coli</i> TGI G 1	260	5.0
<i>E.coli</i> TGI G 2	36.8	5.0
<i>E.coli</i> TGI G 3	1208	2.8
<i>E.Coli</i> TGI G 4	0	—

脂糖凝胶电泳分析。实验结果指出,G 3 所含的重组质粒 pSJ 3 的插入片段最小,约 2.8kb 左右, G1 和 G2 所含重组质粒的插入片段大小相同,约为 5.0kb(图 3)。从图 2 可以看出含有最小插入片段的阳性克隆 G 3 在蛋白酶检测平板上所形成的透明圈最小,但液体培养的胞外酶活性最高(表 1)。

(三) 嗜麦芽假单胞菌 P27 及其重组基因的表达

将阳性克隆 G1, G2, G3 以及嗜麦芽假单胞菌 P27 分别培养在检测碱性蛋白酶活性的液体培养基中(培养 G1, G2, G3

的培养基含有 170μg/ml 的氨苄青霉素), 置 30°C, 振荡培养 66 h 后, 进行酶活测定, 并以 G4 作负对照, 该菌是在转化过程中所形成的蓝色转化子, 也就是说此转化子所含质粒无插入片段, 故不产生碱性蛋白酶。本实验检测的是培养液经离心后所获的上清液, 因此实际上是检测能分泌至胞外的碱性蛋白酶。从表 1 可以看出, G 3 产生的碱性蛋白酶活性大约是原始菌株嗜麦芽假单胞菌 P27 的 3 倍多; 而其他两株重组体 G1 和 G2 所产生的酶活比原始

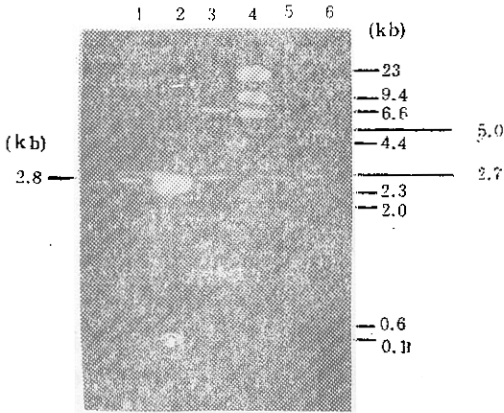


图 3 重组质粒 pSJ1, pSJ2 和 pSJ3 插入 DNA 片段的大小

Fig. 3 The size of the inserted DNA fragment in pSJ 1, pSJ 2 and pSJ 3

1, 2, 5, 6. Restriction digest patterns of pSJ3, pUC 18, pSJ1 and pSJ2 with EcoRI respectively; 4. λ DNA was digested with Hind III

菌株还低。负对照 G 4 没有检测到酶活性(表 1)。将提纯的重组质粒 pSJ1、pSJ 2 和 pSJ3 重新分别转化至大肠杆菌 TGI, 并用同样的方法检测这 3 种重组子的碱性蛋白酶活性, 获得同样的结果。

从我们所获得的 3 株工程菌的发酵实验结果看, 其酶的分量相差甚远, 虽然 G 3 在检测平板上形成的透明圈最小, 但发酵结果却显示出其酶活性最高, 同时也比 G1、G2 菌株高出许多倍。从限制酶酶切分析结果, 已知 G 3 菌所克隆的外源 DNA 片段(2.8kb)较其它两株中的(约 5.0 kb)小, 因此克隆外源 DNA 片段的大小是否与工程菌株的酶分泌量有关还有待进一步研究, 但不同菌株产酶的最适发酵条件是不同的, 所以此 3 株工程菌分泌量的差异很可能与此有关, 此项工作正在研究中。

参 考 文 献

- [1] Rose, A. H.: In, *Economic Microbiology*, Academic Press London, pp.50—112, 1980.
- [2] Halpern, M.G.: *Industrial Enzymes from Microbial source*, Recent Advances, Noyes Data Corporation, USA, pp.50—74, 1981.
- [3] Kelly, C.T, et al.: *Process Biochemistry*, 11:3—9, 1976.
- [4] Fairbairn, D. G, et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 62:103—113, 1987.
- [5] Mckeller, R.C.: *J. Appl. Bacteriol.*, 60:37—44, 1986.
- [6] Kobayashi, H. et al.: *Agr. Biol.Chem.*, 49:693—698, 1986.
- [7] Pshirkov, S. et al.: *Mikrobiologia Sun*, 51:272—274, 1982.
- [8] Lyle, V. et al.: *Appl. Environ. Microb.*, 39:92—96, 1980.
- [9] Kobayashi, H. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 57:375—378, 1979.
- [10] 江盛梅等: 武汉大学学报(自然科学版), 生物工程专刊, 1990.
- [11] Frederick, M. A, et al.: In, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987.
- [12] Humphreys, C D, et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 383:457—463, 1975.
- [13] Close, T. G, et al.: *Gene*, 20:305—316, 1982.
- [14] Maniatis, T. et al.: In *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA, pp.458—459, 1982.
- [15] 彭珍荣等: 微生物学杂志, 6:29—31, 1986年
- [16] Spies, J.R.: *Method Enzymeology*, Vol. III, Academic Press Inc, New York, p.467, 1975.

Cloning and Expression of Alkaline Protease Genes from *Pseudomonas maltophilia* P27 in *Escherichia coli*

Jiang Shenmei Shen Ping Peng Zhenrong
(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Alkaline protease gene from *P. maltophilia* P27 have been cloned into *E. coli* by using plasmid vector pUC 18. Three positive clones G 1, G 2 and G3 were obtained, which are capable of expressing and secreting alkaline protease. The activity of alkaline protease of G3 strain is the highest, about 3 to 4 times higher than that of original strain *P. maltophilia* P27. By restriction analysis of recombinant plasmid pSJ1 pSJ2 and pSJ3, 2.8kb EcoRI insert was found in recombinant plasmid pSJ3, 5.0 kb EcoRI insert was found in the other two recombinant plasmid pSJ1 and pSJ2.

The study for the optimum fermentation condition of the three strains are going on in order to obtain stable and high yield alkaline protease strains.

Key words: Alkaline protease; gene cloning and expression; *P. maltophilia*