

以 CotX 为分子载体在枯草芽胞杆菌芽胞表面展示绿色荧光蛋白

李倩^{1,2}, 宁德刚¹, 吴春笃¹

1 江苏大学环境学院, 镇江 212013

2 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

摘要: 芽胞衣壳蛋白 CotB、CotC、CotG 等可作为芽胞表面展示外源蛋白的分子载体, 制备口服重组疫苗或具有催化活性的重组酶。CotX 为枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 芽胞衣壳中的另一种结构蛋白。为证明 CotX 能否作为分子载体将外源蛋白展示在芽胞表面, 本研究将 *cotX* 基因与绿色荧光蛋白基因 *gfp* 的编码序列进行基因重组, 构建融合表达 CotX-GFP 的整合型重组质粒, 将该质粒转化枯草芽胞杆菌, 筛选重组菌株并诱导产生芽胞, 观察到重组芽胞表面具有 GFP 绿色荧光。结果表明枯草芽胞杆菌的芽胞衣壳蛋白 CotX 位于芽胞衣壳外层, 可作为芽胞表面展示外源蛋白的载体分子。

关键词: 枯草芽胞杆菌, 芽胞表面展示, CotX, 绿色荧光蛋白

Surface display of GFP using CotX as a molecular vector on *Bacillus subtilis* spores

Qian Li^{1,2}, Degang Ning¹, and Chundu Wu¹

1 School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2 Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: Spore coat proteins, such as CotB, CotC, CotG *et al.*, are able to efficiently display exogenous protein on spore surface for preparing oral vaccines or enzymes. CotX is another structural protein of spore coats of *Bacillus subtilis*. To investigate whether CotX could carry target protein onto the spore surface, we constructed a recombinant integrative plasmid, designated as pJS749, which carries a recombinant *cotX-gfp* gene under the control of the *cotX* promoter. We transformed pJS749 into *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻), an α -amylase inactivated mutant DRJS749 was selected and confirmed to be a double crossover integrant, where *cotX-gfp* fragment was integrated into the chromosome. After induction of spore formation, significant green fluorescence was observed on spore surface of strain DRJS749 under fluorescent microscopy. This suggests that CotX is associated with the outer part of the coat. CotX can therefore be used as a molecular vehicle for spore surface display of exogenous proteins.

Keywords: *Bacillus subtilis*, spore surface display, CotX, GFP

Received: September 25, 2009; **Accepted:** November 16, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2006075), Postdoctoral Fund of China (No. 20070411025).

Corresponding author: Degang Ning. Tel: +86-511-88797818; E-mail: 306502@ujs.edu.cn

江苏省自然科学基金 (No. BK2006075), 中国博士后基金 (No. 2007AA021702) 资助。

枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 在营养缺乏等逆境条件诱导下, 营养细胞分化形成休眠体——芽胞。芽胞由皮层、芽胞衣壳和芽胞外壁构成。外层的芽胞衣壳主要由疏水的衣壳蛋白构成, 具有抗酶解、抗药物功能。芽胞的形成是一系列调控基因和结构基因按一定时序调控表达的过程。这些基因包括芽胞衣壳蛋白基因以及调控基因, 如 *cotA*、*cotB*、*cotC*、*cotF*、*cotG* 等 20 余种^[1]。由于芽胞的特殊结构使其具有独特的抗逆性, 能在极端环境 (如高温、干燥、化学药物) 中长期存活, 能顺利通过动物消化道屏障等特点, 以芽胞衣壳蛋白为分子载体, 通过芽胞表面展示技术将外源目的蛋白展示于重组枯草芽胞杆菌芽胞表面, 制备具有生物活性的重组芽胞的研究倍受关注^[2-3]。已有报道成功利用枯草芽胞杆菌芽胞衣壳蛋白 *CotB*^[4]、*CotC*^[5] 以及 *CotG*^[6] 为分子载体, 将具有免疫保护作用的抗原蛋白或酶展示于芽胞表面, 构建具有免疫学功能或催化活性的重组芽胞。

由于不同的芽胞衣壳蛋白的分子结构, 以及在芽胞中的组成存在差异, 导致不同的芽胞衣壳蛋白作为分子载体表面展示外源蛋白的重组芽胞生物学活性也不同^[4-5]; 利用芽胞表面展示技术同时展示多种不同抗原蛋白或酶, 制备多价重组抗原疫苗或不同催化酶的重组芽胞, 需要多种具有运载功能的衣壳蛋白作为载体。但在已报道的 20 余种枯草芽胞杆菌芽胞衣壳蛋白中, 只有部分衣壳蛋白位于芽胞衣壳的外层, 但它们在芽胞衣壳中的准确位置以及暴露于芽胞表面的结构域并不清楚^[1], 能否作为分子载体将外源蛋白展示于芽胞表面需要通过实验证明。因此, 筛选新的能有效展示外源目的蛋白的载体分子, 用于芽胞表面展示外源蛋白尤为关键。本研究以绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 基因 (*gfp*) 为报告基因, 以枯草芽胞杆菌芽胞衣壳蛋白 CotX 为分子载体, 通过芽胞表面展示技术将 GFP 展示于芽胞表面。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

用于质粒克隆的宿主菌 *E. coli* DH5 α 在 37 $^{\circ}$ C

LB 培养基中培养, 含有质粒的大肠杆菌加入相应的抗生素 (氨苄青霉素工作浓度均为 50 μ g/mL)。*Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 来源于 *Bacillus Genetic Stock Center*, Department of Biochemistry, The Ohio State University。质粒 pBAD-gfpuv^[7] 由中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员提供。pJS700a 由本实验室构建, 其他质粒均为本实验室保存。

1.2 分子生物学操作

DNA 重组按标准操作方法进行^[8], 枯草芽胞杆菌染色体的提取参照文献[9]。PCR 反应体系中含 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 50 mmol/L MgCl₂, 引物各 100 pmol, 200 μ mol/L dNTPs, 50 ng 模板 DNA, 2.5 U DNA 聚合酶。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。含 *gfp* 编码序列的片段以 gfp-a(5'-GGTACCGCTAGCAAAGGAGAAG-3')、gfp-b(5'-GAATTCTGCAGGTCGACTCTAGAGG-3') 为引物, pBAD-GFPuv 为模板进行 PCR 扩增。含 *cotX* 的片段以 cotX-a(5'-GTCTAGATTACTTTGCTGCCGACGAGA-3')、cotX-b(5'-GGTACCGAGGACAAGAGTGATAACTAGGATG-3') 为引物, 以 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物或酶切产物用凝胶回收试剂盒 (上海生工生物工程技术有限公司) 回收后用于克隆。用于枯草芽胞杆菌重组菌株鉴定的引物为 amyE-11:5'-GAGATCTCATTGCTCGGGCTGTATGACTGG-3' 和 amyE-22:5'-GTTACACCATCACTGTTCGTTCC-3'。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD-18T 等均购自宝生物 (大连) 有限公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 来源于 PCR 产物的克隆片段由上海生工生物工程技术有限公司测序确定。

1.3 枯草芽胞杆菌的转化

以两步法制备 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 感受态细胞^[10], 枯草芽胞杆菌的转化参照文献[10]进行。用含 0.4 μ g/mL 红霉素的 LB 平板于 37 $^{\circ}$ C 培养筛选转化子。

1.4 枯草芽胞杆菌淀粉酶活性分析

从平板上挑枯草芽胞杆菌单菌落接种在 3 mL 液体 LB 培养基中培养过夜, 取 5 μ L 菌液涂于含 1% 淀粉的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 取 2 mL 碘液喷于淀粉平板上, 并对染色平板拍照。碘液的配制: 碘化钾 2 g, 碘 1 g, 先将碘化钾溶于少量蒸馏水中, 待全溶解后再加碘, 振荡溶解后稀释至 300 mL, 保存在棕色玻璃瓶内。

1.5 枯草芽胞杆菌芽胞的诱导和显微拍摄

以 DSM 培养基诱导 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 或重组菌株 DRJS749 形成芽胞^[9]。DSM 培养基的配制: 0.8% 肉汤营养液(Difco), 0.1% KCl, 0.025% MgSO₄·7H₂O, 1.0 mmol/L Ca(NO₃)₂, 10 μ mol/L MnCl₂, 1.0 μ mol/L FeSO₄。取 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 或重组菌株 DRJS749 单菌落接种于 3 mL DSM 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 40 h, 5000 r/min 离心 10 min 收集芽胞, 重悬于 1 mL 无菌水中。以终浓度为 2 mg/mL 溶菌酶 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 破坏营养细胞, 5000 r/min 离心 10 min 沉淀芽胞, 加 1 mL 水重悬芽胞。取 10 μ L 芽胞悬液涂于载玻片上, 盖上盖玻片, 利用装置在 Leica DFC300FX 荧光显微镜上的 LEICA QWIN LITE 图像分析软件辅助的 Leica DFC300FX 冷 CCD 数码摄像头进行拍摄。GFP 荧光通过 Sapphire GFP 滤光片组件 (激发光滤光片 BF470/40, dichromatic mirror: 500, 发射光滤片: BP 525/50) 观察, 拍摄快门速度为 270 ms。

2 结果

2.1 融合表达 CotX-GFP 的整合型重组质粒及重组菌株的构建策略

为证明 CotX 能否作为载体将外源蛋白展示于芽胞表面, 以 *gfp* 为报告基因, 构建融合表达 CotX-GFP 的整合型重组质粒 (图 1)。在枯草芽胞杆菌整合平台质粒 pJS700a 中, 含 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 淀粉酶基因 *amyE* 片段 (547~1643 nt), 在该片段中的 *Sma* I 位点插入红霉素抗性基因 *Em*^r, 下游含多克隆位点。分别将 *cotX* 及 *gfp* 编码序列插入 pJS700a 中, 得到含融合表达 CotX-GFP 的整合型重组质粒。该重组质粒转化枯草芽胞杆菌, 通过质粒

上的 *amyE* 片段与宿主染色体上的同源片段双交换重组获得枯草芽胞杆菌重组菌株, 诱导重组菌株产生重组芽胞, 观察重组芽胞表面 GFP 的表达。

2.2 重组质粒 pJS747 的构建

根据 *Bacillus subtilis* 168 染色体上的 *cotX* (GenBank Accession No. NP_389058) 序列, 设计并合成引物 *cotX*-a 和 *cotX*-b。为便于克隆, 上游引物 *cotX*-a 添加了 *Xba* I 位点, 下游引物 *cotX*-b 添加了 *Kpn* I 位点。以 *cotX*-a 和 *cotX*-b 为引物, *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 染色体 DNA 为模板, 扩增含 *cotX* 基因的启动子和不含终止密码子的编码序列, 扩增产物大小为 890 bp, 回收并克隆于 pMD-18T 载体中, 测序确定克隆片段正确后命名 pJS738。以 *Xba* I 和 *Kpn* I 完全酶切 pJS738, 回收 *cotX* 片段, 克隆于 pJS700a 相应位点, 重组质粒命名为 pJS747 (图 2)。

2.3 融合表达 CotX-GFP 整合型重组质粒的构建

以 *gfp*-a 和 *gfp*-b 为引物, 质粒 pBAD-GFPuv 为模板, 扩增含 *gfp* 基因的编码序列片段 (约 774 bp), 并克隆于 pMD-18T 载体中, 测序确定序列正确后命名为 pJS289。以 *Kpn* I 和 *Eco*R I 完全酶切 pJS289, 回收 *gfp* 片段, 并克隆于 pJS747 相应的位点, 使 *cotX* 和 *gfp* 的编码序列处于同一阅读框中, 得到的整合型重组质粒命名为 pJS749 (图 2)。该质粒中含来自 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 染色体上的淀粉酶基因的 5'端和 3'端的 DNA 片段; 供 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 转化子筛选的红霉素抗性基因 *Em*^r; 以及融合表达 CotX-GFP 的重组基因片段, 该片段含 *cotX* 启动子序列、不含 *cotX* 终止密码子的 CotX 编码序列和 GFP 的全编码序列, 该重组基因由 *cotX* 启动子控制, 在诱导芽胞分化时融合表达 CotX-GFP。

2.4 融合表达 CotX-GFP 重组枯草芽胞杆菌的构建

为构建融合表达 CotX-GFP 的重组枯草芽胞杆菌, 以 *Bgl* II 酶切质粒 pJS749 使其线性化, 并转化 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻)。因重组质粒上的整合片段可与染色体上的同源片段双交换重组, 淀粉酶基因因插入重组片段 *Em*^r-*cotX*-*gfp* 失活, 融合表达 CotX-GFP 的重组基因整合于染色体上 (图 4A)。为筛选 *Em*^r-*cotX*-*gfp* 插入淀粉酶基因 *amyE* 中的转化

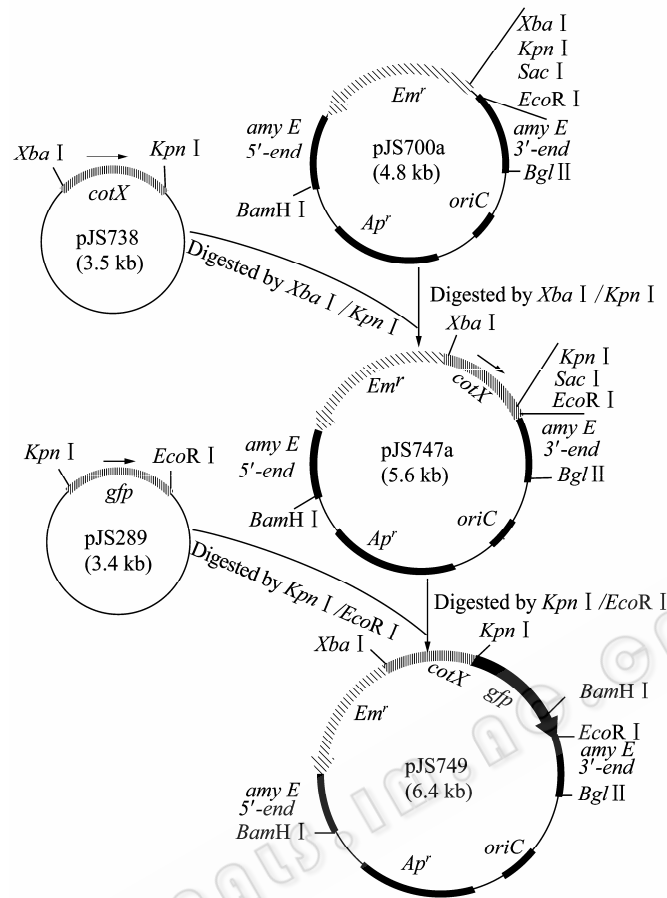


图1 融合表达 CotX-GFP 的整合型重组质粒构建流程图

Fig. 1 Construction of integrative recombinant plasmid for fusion expression of CotX-GFP. *amyE* 5'-end and *amyE* 3'-end are integrative fragments from amylase gene of *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻), *Em^r*: gene resistant to erythromycin; *Ap^r*: gene resistant to penicillin; *OriC*: replication origin of *E. coli*.

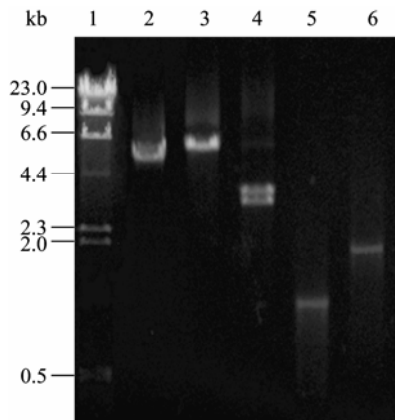


图2 重组质粒 pJS738 和 pJS749 的鉴定

Fig. 2 Examination of plasmid pJS738 and pJS749 by PCR and enzyme digestion. 1: λ DNA/*Hind* III; 2: pJS700a digested by *Bam*H I; 3: pJS747 digested by *Bam*H I; 4: pJS749 digested by *Bam*H I; 5: identification of pJS747 by PCR using *cotX*-a/*cotX*-b as primers; 6: identification of pJS749 by PCR using *cotX*-a/*gfp*-b as primers.

子, 将其接种于淀粉平板, 培养后以碘液染色, 转化子及其周围被碘液染成蓝色, 对照菌株 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 菌落及周围产生透明的淀粉水解圈 (图 3)。表明转化子中的淀粉酶基因失活, *Em^r-cotX-gfp* 片段通过插入淀粉酶基因而整合于重组菌株的染色体上。

为进一步证明重组菌株中淀粉酶基因的失活是由于 *Emr-cotX-gfp* 的插入所致, 分别以 *amyE*-11/*amyE*-22、*cotX*-a/*gfp*-b 为引物, 染色体为模板, PCR 扩增鉴定重组菌株, 分别检测到约 4.0 kb 和 1.7 kb 的扩增片段。表明重组菌株染色体上含有 *cotX-gfp* 重组基因, 并且 *Emr-cotX-gfp* 重组片段插入淀粉酶基因中 (图 4)。将鉴定后的转化子命名为 DRJS749。

2.5 表面展示 *gfp* 的重组芽胞鉴定

将重组菌株 DRJS749 接于 DSM 培养基中培养,

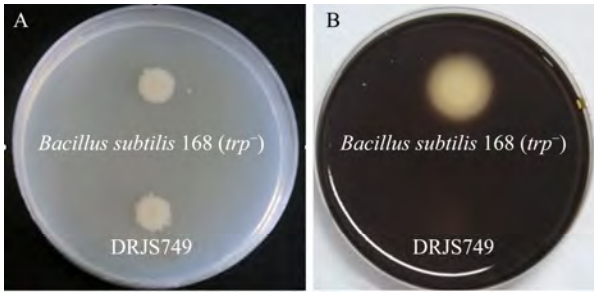


图 3 重组菌株 DRJS749 淀粉酶活性分析
 Fig. 3 Identification of DRJS749 by analysis of amylase activity. (A) *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) and DRJS749 were grown on LB plates containing 1% starch. (B) The plate was stained with iodine to detect the α -amylase activity, which was indicated by the transparent plaque.

分别于 20 h 和 40 h 取菌液滴于载玻片上,以 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 为对照, 荧光显微镜观察细胞荧光。培养 20 h 的重组菌株 DRJS749 和 *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 均为营养细胞, 荧光显微镜下均未观察到绿色荧光 (数据未显示); 而培养 40 h 后细胞分化成芽胞, 重组菌株 DRJS749 的芽胞表面具有显著的绿色荧光; 在相同的条件下, *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) 芽胞未见绿色荧光 (图 6)。表明重组菌株营养细胞不表达 GFP; 当诱导产生芽胞时, 在 *cotX* 启动子控制下表达 CotX-GFP, GFP 通过芽胞衣壳蛋白 CotX 展示于芽胞表面。

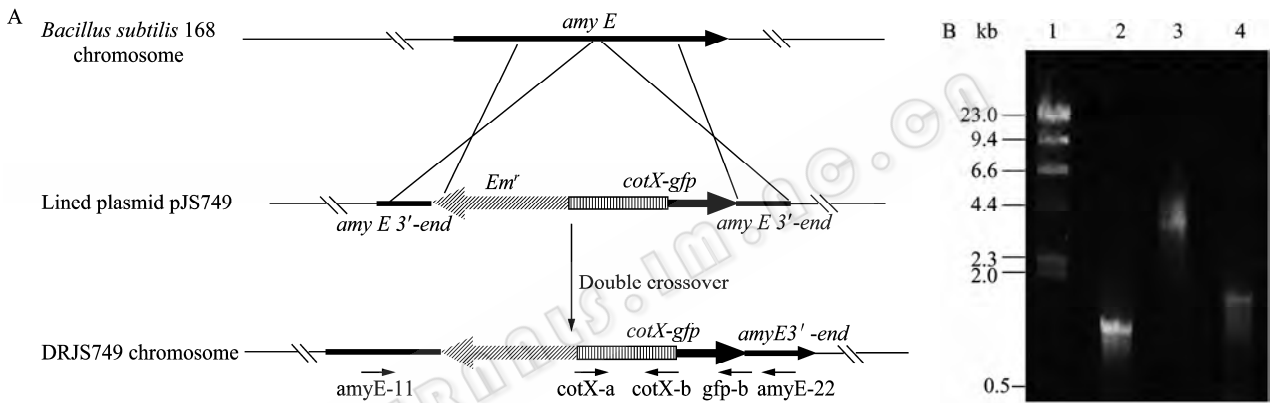


图 4 菌株 DRJS749 中重组基因片段的鉴定
 Fig. 4 Identification of the recombinant fragment of DRJS749. (A) Schematic diagram of the integration of *Em'*-*cotX-gfp* in chromosome. (B) PCR examination of *Em'*-*cotX-gfp* fragment integrated into the chromosome of *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻). 1: λ DNA/*Hind* III; 2, 3: *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) and DRJS749, using *amyE*-11/*amyE*-22 as primers; 4: examination of *cotX-gfp* fragment of DRJS749 using primer *cotX*-a/*gfp*-b.

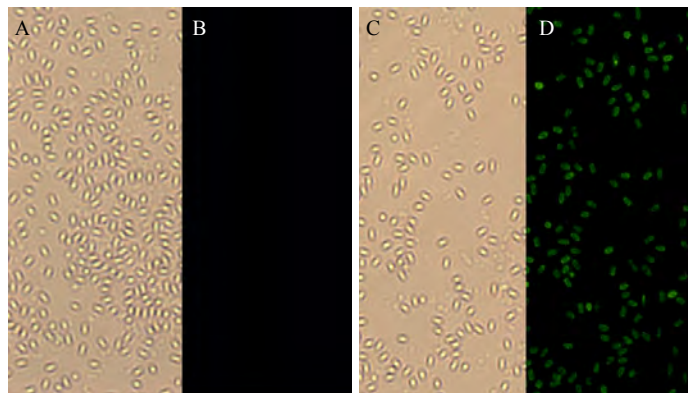


图 5 重组菌株 DRJS749 芽胞表面 GFP 的荧光检测
 Fig. 5 Detection of GFP fluorescence on spore surface of DRJS749. (A, C) Bright-field images of *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) and DRJS749 (10 \times 100 oil lens), respectively. (B, D) GFP fluorescence images of *Bacillus subtilis* 168(*trp*⁻) and DRJS749 (10 \times 100 oil), respectively.

3 讨论

用于芽胞表面展示外源蛋白的载体蛋白必须满足以下条件: 位于芽胞衣壳外层的衣壳蛋白; 有可融合外源蛋白并暴露于芽胞表面的结构域。枯草芽胞杆菌芽胞由约 20 余种衣壳蛋白形成的衣壳包裹, 已证明 cotA、cotB、CotC、CotF 和 CotG 等组成芽胞衣壳的外层。Isticato 等^[4]利用 CotB 作为芽胞表面展示外源抗原的载体蛋白, 成功地在枯草芽胞杆菌芽胞表面展示了破伤风毒素 (TTFC) C 末端的 459 个氨基酸片段。用芽胞衣壳的另一蛋白成分 CotC 作为融合载体蛋白, 分别将 TTFC 和大肠杆菌的不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 展示于芽胞表面。Kwon 等^[6]以 CotG 为蛋白载体将半乳糖苷酶展示于枯草芽胞杆菌芽胞表面, 重组芽胞在水-有机相反应体系中具有半乳糖苷酶催化活性, 并且较化学方法固定于芽胞表面的半乳糖苷酶有更好的稳定性。表明位于芽胞衣壳外层的衣壳蛋白 CotB、CotC 和 CotG 可用作芽胞表面展示外源蛋白的载体分子。

CotX 是枯草芽胞杆菌芽胞的另一种衣壳蛋白^[11], 但在芽胞衣壳外层中的准确定位以及其暴露于芽胞衣壳外的结构域还不清楚。本研究以 CotX 作为载体蛋白, 以 *gfp* 为报告基因, 构建了含重组基因 *cotX-gfp* 的重组枯草芽胞杆菌菌株。重组菌株在营养丰富的培养基中能以营养细胞的形式进行增殖, 在寡营养培养基或营养不足时, 可诱导形成芽胞, 并且其他生长特征较亲本菌株无明显的改变。诱导重组菌株产生芽胞, 观察到重组芽胞表面具有 GFP 绿色荧光。表明 CotX 位于枯草芽胞杆菌芽胞衣壳的外层, 其 C 末端的部分氨基酸暴露于芽胞表面; 同时, CotX 可作为芽胞表面展示外源蛋白的载体分子, 这使芽胞表面展示技术中载体分子有更多的选择余地, 尤其在芽胞表面同时展示多种抗原蛋白或多种酶蛋白, 制备多价抗原疫苗或复合酶催化系统的重组芽胞, 具有重要的应用价值。但 CotX 作为载体分子将外源

蛋白展示于芽胞表面的运载能力, 以及展示不同外源蛋白的能力有何差异, 有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Henriques AO, Moran CP Jr. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol*, 2007, **61**: 555–588.
- [2] Oggioni MR, Ciabattini A, Cuppone AM, *et al.* *Bacillus* spores for vaccine delivery. *Vaccine*, 2003, **2**: S96–101.
- [3] Zhang K, Ning DG, Xu WD. Advance on the surface display of recombinant vaccines on *Bacillus subtilis* spores. *Microbiol China*, 2006, **33**(5): 134–137.
张柯, 宁德刚, 徐卫东. 枯草芽胞杆菌芽胞表面展示重组疫苗研究进展. *微生物学通报*, 2006, **33**(5): 134–137.
- [4] Isticato R, Cangiano G, Tran HT, *et al.* Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 6294–6301.
- [5] Mauriello EM, Duc LH, Isticato R, *et al.* Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine*, 2004, **22**: 1177–1187.
- [6] Kwon SJ, Jung HC, Pan JG. Transgalactosylation in a water-solvent biphasic reaction system with beta-galactosidase displayed on the surfaces of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(7): 2251–2256.
- [7] Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, *et al.* Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(3): 315–319.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Nicholson WL, Setlow P. Sporulation, germination and outgrowth//Harwood C, Cutting S, ed. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester, UK: Wiley, 1990: 391–451.
- [10] Cutting SM, Vander-Horn PB. Genetic analysis//Harwood CR, Cutting SM, ed. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester, UK: Wiley, 1990: 27–74.
- [11] Krajčiková D, Lukáčová M, Müllerová D, *et al.* Searching for protein-protein interactions within the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol*, 2009, **191**(10): 3212–3219.