

杆菌属中蛋白酶基因的筛选及表达

刘白玲* 何先祺

(四川成都科技大学皮革工程系, 成都 610065)

张义正

(四川大学生物工程系, 成都 610064)

蛋白酶是大多数杆菌产生的具有重要工业价值的水解酶, 广泛应用于轻工、纺织、食品、化妆、洗涤剂及皮革工业中^[1]。早在80年代初, 芽孢杆菌中的蛋白酶已占商品酶产量的38%, 而霉菌蛋白酶仅为0.8%^[2]。因而, 对蛋白酶基因的分离及高效率表达一直是基因工程领域中重要的研究内容之一^[3-6]。

1 蛋白酶基因的筛选

对蛋白酶基因的筛选可采用多种方法, 如“免疫法”、“DNA杂交法”、“遗传互补法”等。但用“免疫法”筛选时, 须以高纯度的蛋白酶作抗原, 制备特异性强的抗体; 用“DNA杂交法”筛选时, 则需要与所分离的基因具有高度同源性的蛋白酶基因片段。“遗传互补法”则因其具有简捷、直观、可一次筛选出具有生物活性的蛋白酶基因而得以广泛使用。在用这一方法进行筛选时, 常用的宿主菌是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草杆菌 (*Bacillus Subtilis*)。

1.1 以 *E. coli* 为宿主菌的筛选

E. coli 的遗传背景清楚, 可用于分离各种基因的克隆载体种类繁多, 因而在蛋白酶基因的筛选伊始, 多采用该菌作为宿主菌。但 *E. coli* 能否使筛选成功, 还与以下因素有关。

1.1.1 蛋白酶基因的种类: Koide 等人^[7]在对 *B. subtilis* 中的胞外酶——丝氨酸蛋白酶基因进行筛选时, 用 BamHI 部分酶切 *B. subtilis* IFO 3010 的总DNA, 将所得片段插入 pBR322 的相同酶切位点, 连接后转化 *E. coli* C600 hsdR hsdM, 然后涂布于含有脱脂牛奶的平板上, 经 37℃ 3-4 天培养, 在大约 3 000 个 Amp^r 转化子中, 发现有一个可形成十分微弱的水解圈。

1.1.2 蛋白酶基因的来源: Yamada 等^[8]将嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) 的中性蛋白酶基因插入 *E. coli* 的表达型载体, 转化 *E. coli* JM109。该克隆菌不但可以在含有酪蛋白的平板上产生水解圈, 而且经 24 小时培养后, 培养物上清液中的蛋白酶活性高达 120u/ml。

但用 *E. coli* 为宿主菌筛选 *B. subtilis* 中的蛋白酶基因, 直接筛选成功的例子不多。对此比较一致的认识是: 枯草杆菌中的某些蛋白酶基因, 如中性蛋白酶基因, 在表达水平较高时, 过多的蛋白酶积累会妨碍 *E. coli* 的生长, 甚至导致细胞死亡, 从而使筛选失败。例如, Wang^[9]的研究表明, 只有除去了枯草杆菌蛋白酶基因中的核糖体结合位点, 使该基因在大肠杆菌中以低水平表达, 方能以 *E. coli* 作为宿主菌进行中性蛋白酶基因的筛选, 并且可以在含有 1% 的脱脂牛奶平板上观察到该基因的表达产物。

1.1.3 检测的方法: 用 *E. coli* 筛选多种蛋白酶基因较少成功的原因, 除上述之外, 检测方法也尤为重要。因为 *E. coli* 在多数情况下不能将杆菌属中的蛋白酶基因表达产物分泌到胞外, 因而不能在含有酪蛋白底物的平板上进行直接检测^[7,10]。作者的研究表明, 完整的中性蛋白酶基因是可以在 *E. coli* 中表达的。其表达产物主要存在于大肠杆菌的细胞质中, 部分存在于细胞周质中(待发表)。只有对转化菌进行细胞壁裂解^[11]、或改变细胞壁、细胞膜的通透性^[12], 方能释放出细胞内部的蛋白酶而进行筛选。因而, 适当的检测方法对于以大肠杆菌为

1992-02-12 收稿

* 现在地址: 四川都科技大学高分子研究所

宿主菌筛选蛋白酶基因具有关键性的作用。

1.2 以 *B. subtilis* 为宿主菌的筛选

以枯草杆菌的中性、碱性蛋白酶基因缺陷型菌株为宿主菌筛选蛋白酶基因,是最常用的筛选方法。因为它可将克隆的蛋白酶基因产物分泌至胞外,因而可以在含有蛋白酶底物的检测平板上直接进行筛选。例如,Sloma^[10]对枯草杆菌的 minor 胞外蛋白酶基因的筛选,Koide^[7]对枯草杆菌的 major 胞内丝氨酸蛋白酶基因 (ISP-I) 的筛选,Kubo^[13]对嗜热脂肪芽孢杆菌中耐高温性中性蛋白酶基因的筛选等,均以枯草杆菌的蛋白酶基因缺陷型菌株为宿主菌。作者以 *B. subtilis* DB104 (his npr R2 nprE18 ΔaprA3)^[14] 为宿主菌,采用自己建立的“枯草杆菌原生质体转化最佳条件”^[15],从蛋白酶高产菌 *B. subtilis* ML (*B. subtilis* AS1.398 的复合诱变正突变株) 中成功地克隆到了中性蛋白酶基因^[16]。

一个值得注意的研究是 Vasantha 等^[17] 在从解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 中克隆包括信号肽在内的中性、碱性蛋白酶基因的完整开放阅读框架时,则以含有 pUB110 的 *B. subtilis* (trpC2 metB10 lys-3) 为宿主菌,用插入有供体菌染色体片段的 pBD64 为载体进行转化,并直接在含有脱脂牛奶的氯霉素抗性平板上筛选出含有蛋白酶基因的转化子。作者认为,在筛选具有高活性的蛋白酶基因时,他们所用的方法不需要以不产蛋白酶的突变体作为宿主菌,也不一定要知道该基因的氨基酸顺序。这种方法已被证明是从各种 *Bacillus* spp 中克隆蛋白酶基因的有效途径。Ortlepp 等^[18] 在分离地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 的耐高温型 α-淀粉酶基因时也使用了这一方法,使转化频率提高了 100—1 000 倍。这一方法被称做“重组获救法”,是依靠重组 DNA 进入细胞后,与受体细胞中预先存在的载体 DNA 同源部分发生重组,从而产生了有活性的质粒分子。

2 蛋白酶基因的表达

蛋白酶基因的表达受到多种因素的制约,其中包括基因自身的结构特点、使用的克隆系

统及外部培养条件等。

2.1 基因 5'-端非编码区核苷酸顺序对表达的影响

这主要指基因本身的启动子顺序、mRNA 与核糖体的识别及结合位点 (SD 序列),以及 SD 序列与转译起始密码子之间的 DNA 顺序与距离^[19]。它们之所以影响到蛋白酶基因的表达水平,是因为它们的结构影响了基因在转录与转译过程中与 RNA 聚合酶、核糖体的相互识别与结合能力。如 Ferrari 等^[20] 用对启动子进行缺失的方法研究启动子结构对枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin) 基因表达的影响,发现启动子的变化对该基因与 LacZ 的融合蛋白的表达水平有直接的影响。Band 等^[21] 的研究表明,不同的宿主菌对基因的 SD 序列的识别与结合能力是不同的,SD 序列的结构对基因的能否表达及表达水平有明显的影响。

Kubo 等^[22] 在研究嗜热脂肪芽孢杆菌中的热稳定性中性蛋白酶基因 nprM 及 nprT 在枯草杆菌中的表达时发现,mRNA 的二级结构也会影响到蛋白酶的表达水平。这主要指蛋白酶结构基因内的堆积区 (Stacking region) 的影响。其原因可能是:(1) 当 mRNA 被转录时,其堆积区具有终止子功能。(2) 堆积区可能会稳定 mRNA 的二级结构,于是便阻碍了翻译效率。因而,基因编码区中的堆积区域越多、越长,蛋白酶基因表达的效率就越低。

2.2 克隆系统对表达的影响

克隆系统指所使用的宿主菌与克隆载体。在蛋白酶基因的克隆及表达的研究中,在宿主菌 *E. coli* 中的表达效率远远低于 *B. subtilis*,即使用含有信号肽编码序列的外源基因,其表达产物最终还是在细胞周质中积累,这也在一定程度上限制了大肠杆菌作为胞外酶基因表达的宿主菌^[23]。作者的研究结果也证实了这一点(待发表)。利用不同枯草杆菌菌株表达蛋白酶基因时,导入蛋白酶基因后的克隆菌的蛋白酶活性均高于宿主菌自身,但并不一定高于该基因的供体菌。如分别来自地衣芽孢杆菌菌株 C₁₂₁₃ 和 2709 的碱性蛋白酶基因^[24],在 *B.*

subtilis DB104 和 BG2036 中的表达水平均为供体菌表达水平的 20%。但也有蛋白酶基因在宿主菌中的表达水平高于野生型菌株的报道^[25,26]。

为了大幅度提高目的基因的表达水平,常采用高拷贝的表达型载体。在这种载体中常常插入了一些基因的强启动子,如 α -淀粉酶基因启动子;或插入易被宿主菌的核糖体所识别的SD序列,如pNQ122^[27]、pBS42^[21]等均属这类载体。

值得注意的是,克隆系统是一个十分复杂而又精巧的平衡体系。它对于一切打破自身生理平衡的过程总是排斥的。蛋白酶基因的高表达固然与插入质粒的高拷贝有关,但这种高拷贝往往会导致重组质粒自身的不稳定,或者因妨碍宿主细胞的生长而使克隆菌不稳定^[28]。Leonhardt^[29]的研究表明,提高重组质粒的稳定性可采取减小质粒的分子量、降低质粒拷贝数、延缓宿主菌生长速度等方式来实现。对于体内重组现象频繁的枯草杆菌而言,选用重组缺陷型菌株对于提高重组质粒的稳定性尤为重要^[30]。

2.3 培养条件对表达的影响

培养条件是影响蛋白酶基因表达的外部条件。其中培养基的组成、培养温度和菌体生长速度对表达的影响很大。培养基中的组份可以通过各种途径来影响克隆菌的稳定性,从而影响蛋白酶基因的表达水平。研究表明,丰富培养基会增加质粒的不稳定性^[31,32],较低的培养温度有助于质粒的稳定性。增加克隆菌在整体细胞中的比例也会提高质粒的稳定性,以获得较高的表达水平。

作者在研究从 *B. subtilis* ML 中克隆的蛋白酶基因的表达时,探讨了多种 *B. subtilis* 宿主菌、培养温度、时间、通气量、培养基 pH 以及抗生素和抗生素浓度等对基因表达水平的影响。结果表明:不同的宿主菌对导入的中性蛋白酶基因的表达水平有较明显的影响。宿主菌本身的蛋白酶活性越低,转化菌蛋白酶活性提高的幅度越大;宿主菌本身的蛋白酶活性越高,

所得转化菌的酶活性也越高。培养温度与培养时间对蛋白酶基因的表达影响显著,不同的抗生素以及同种抗生素的不同浓度对表达有较大的影响。在该实验范围内,培养基的 pH、通气量对表达水平无明显影响(待发表)。

参 考 文 献

- [1] 熊振平, 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 1989. 283-335.
- [2] 普里斯特 F G. 细胞外酶(张宗玉等译), 北京: 科学出版社. 1988. 4-6.
- [3] Burchhardt G, Wienecke A, Bahl H. *Curr Microbiol*, 1991, **22**: 91-95.
- [4] Rufo G A, Sullivan B J, Sloma A, *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**: 1019-1023.
- [5] Sloma A, Roddph C F, Rufo G A, *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**: 1024-1029.
- [6] Yang M Y, Ferrari U, Henner D J. *J Bacteriol*, 1984, **160**: 15-21.
- [7] Koide Y, Nakamura A, Uozumi T, *et al.* *J Bacteriol*, 1986, **167**: 110-116.
- [8] Yamada M, Kubo M, Miyake T, *et al.* *Gene*, 1991, **99**: 109-114.
- [9] Wang L-F, Ekkel S M, Devenish R J. *Biochem International*, 1990, **22**: 1085-1093.
- [10] Sloma A, Ally A, Ally D, *et al.* *J Bacteriol* 1988, **170**: 5557-5563.
- [11] Tsukagoshi N, Ihara H, Yamagata H, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1984, **173**: 58-63.
- [12] Naglak T J, Wang H Y. *Enzyme Microb Technol*, 1990, **12**: 603-611.
- [13] Kubo M, Imanaka T. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 1883-1892.
- [14] Kawamura F, Doi R H. *J Bacteriol*, 1984, **160**: 442-444.
- [15] Liu B-L, Zhang Y-Z, He X-Q. *Texts of papers in International Conference of Leather Science and Technology*, 1992, 206-214.
- [16] Liu B-L, zhang Y-Z, He X-Q. *Texts of papers in International Conference of Leather Science and Technology*, 1992, 215-223.
- [17] Vasantha N, Thompson L D, Rhodes C, *et al.* *J Bacteriol*, 1984, **159**: 811-819.
- [18] Ortlepp S A. *Gene*, 1983, **23**: 267-276.
- [19] 齐义鹏, 黄永秀, 梁明山. 基因工程原理与方法, 成都: 四川大学出版社, 1988, 215-225.

- [20] Ferrari E, Henner D J, perego M, *et al.* J Bacteriol, 1988, **170**: 289-295.
- [21] Band L, Henner D J. DNA, 1984, **3** (1): 17-21.
- [22] Kubo M, Imanaka T. J Bacteriol, 1989, **171**: 4080-4082.
- [23] Fujii M, Takagi M, Imanaka T, *et al.* J Bacteriol, 1983, **154**: 831-837.
- [24] 吴东宝, 杨秀琴, 吴经才. 遗传, 1992, **14** (3): 14-16.
- [25] Takirishi E, Saito K, Kondo T, *et al.* Jpn. 1989, Kokai Tokkyo Koho JP 01, 141, 596 (89. 141. 596).
- [26] Toma S, Delbue M, Grandi G. Eur. Pat. 1986, Appl EP 179, 025.
- [27] 蒋如璋, 乔明强. 生物工程学报, 1988, **4** (4): 278-286.
- [28] 李永红, 王二力, 俞俊棠. 生物工程学报, 1988, **4** (2): 81-86.
- [29] Leonhardt H, Alonso J C. Gene, 1991, **103**: 107-111.
- [30] Keggins K M, Lovett P S, Duvall E J. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, **75**: 1423-1427.
- [31] Imanaka T, Tsunekawa H, Aiba S. J Gen Microbiol, 1980, **118**: 253-261.
- [32] Shoham Y, Demain A. L. Biotechnol Bioeng, 1991, **37**: 927-935.