

# 一种 $\beta$ -内酰胺酶基因的重组与表达\*

王 武

(发酵系)

## 摘 要

腊样芽孢杆菌的 $\beta$ -内酰胺酶类都属可分泌型的, 每种酶以不同长短的肽链形式存在, 其调节机理也不完全清楚。为此我们克隆了菌株5/B的 $\beta$ -内酰胺酶I的基因penPC, 完整地分析了基因的DNA序列, 并将它同菌株569/H的相应基因进行了比较。两个基因的DNA序列及转译产物的分子量相差不大, 但其信号多肽序列及基因的C端部位有着明显的不同。5/B的penPC基因重组到大肠杆菌中未能得到很好的表达, 但重组到枯草杆菌中则表达得很好, 90%以上的基因产物都能分泌到培养基中。

## 引 言

腊样芽孢杆菌的各种 $\beta$ -内酰胺酶是研究革氏阳性菌蛋白质分泌机理的典型<sup>[1,2]</sup>。对菌株569的研究表明, 它能产生三种诱导型的 $\beta$ -内酰胺酶, 而其自发变异株569/H的相应的三种酶都是组成型的<sup>[3]</sup>。 $\beta$ -内酰胺酶I属于A类内酰胺酶<sup>[4]</sup>, 它较其他两种酶的水解青霉素的活力为高, 而且这种酶几乎全部分泌出体外。这种酶的氨基酸序列的大部分已由Thatcher<sup>[5]</sup>分析得知。最近, 这个酶的基因, penPC, 已被克隆到大肠杆菌中, 其DNA序列也已分析<sup>[6,7]</sup>,  $\beta$ -内酰胺酶II也是胞外酶, 但它在结构与A类酶不相关, 它需要某种金属作为催化辅因子, 对头孢霉素有很高的水解活力。 $\beta$ -内酰胺酶III以两种形式存在, 一种是结合在膜上的脂蛋白形式<sup>[8]</sup>, 另一种是经细胞加工后的可溶性胞外酶形式。它主要水解青霉素。免疫交叉试验表明它与酶I、II都不相似, 却与地衣芽孢杆菌749的脂蛋白型 $\beta$ -内酰胺酶能发生交叉反应。至今还不清楚为什么菌株569会产生三种不同类型的 $\beta$ -内酰胺酶, 只知道它们可能在基因水平上同属于一个调节单位<sup>[2]</sup>。

与菌株569不同, 腊样芽孢杆菌的另一菌株5, 是一株既不能产生也不能被诱导出 $\beta$ -内酰胺酶的野生株<sup>[9]</sup>。奇怪的是, 它的一株自发变异株5/B却能产生组成型的 $\beta$ -内酰胺酶I和II。免疫交叉试验表明它不产生有活性的 $\beta$ -内酰胺酶III, 或其他类似的酶类<sup>[10]</sup>。菌株

本文收到日期: 1984年3月26日。

本文为译文, 英文题目为:

Cloning and Sequencing of the  $\beta$ -lactamase I gene, penPc, of *Bacillus cereus* 5/B and its expression in *Bacillus subtilis*.

原文即将发表在期刊“Nucleic Acids Research”上, 作者为: Wu Wang, Peter, S, F, Me'zes, Yue-qin Yang, J.O. Lampen.

5/B的 $\beta$ -内酰胺酶 I 和酶 II 产量很大, 90%以上的酶活是在培养基中测得。其 $\beta$ -内酰胺酶 I 能与菌株 569/H 酶 I 发生免疫交叉反应, 与地衣芽孢杆菌的 $\beta$ -内酰胺酶则无反应。菌株 5/B 的这个酶的蛋白质初级结构至今未被研究过, 仅是有人通过高速离心法和 SDS 凝胶电泳法发现这个酶的胞外酶分子量比菌株 569/H 相应的酶要大几千个道尔顿<sup>[11]</sup>。

为了探索芽孢杆菌非脂蛋白分泌的分子机理, 我们找到了腊样芽孢杆菌 5/B 的 $\beta$ -内酰胺酶 I 的基因, 把它克隆到大肠杆菌和枯草杆菌中去, 并对整个基因的 DNA 序列进行了分析。这将为弄清以上各菌株的复杂的调节过程提供第一手资料。

## 材 料 与 方 法

### 菌种和培养基

腊样芽孢杆菌的菌株 5/B 由 Cincinnati 大学的 R.Day 教授处得到。菌株 569/H 为加拿大 Waterloo 大学的 T. Viswanatha 教授所赠。大肠杆菌 K-12 的菌株 HB101 的 recA<sup>+</sup> 衍生株, RRI<sup>[12]</sup> 和枯草杆菌 BD170<sup>[13]</sup> 被分别用作转化的受体菌株。所有的枯草杆菌菌株均培养于 34℃, 2%CH/S 培养液中<sup>[14]</sup>, 培养带有质粒 PUB110 的菌株时, 卡那霉素的剂量为 10 $\mu$ g/ml。大肠杆菌菌株均培养于 37℃ 的肉汤培养液中<sup>[16]</sup>, 所加的氨卞霉素、四环素和氯霉素的剂量均为 20 $\mu$ g/ml。

### 染色体和质粒 DNA 的提取制备

腊样芽孢杆菌 5/B 的染色体 DNA 主要按 Dubnau 的方法<sup>[15]</sup> 提取, 所不同之处是当反复从染色体上萃取出蛋白质时, 用氯仿: 异戊醇(24:1)代替了苯酚。以霰弹效应法将上述纯净的染色体 DNA 克隆到大肠杆菌中去所用的质粒载体为 PRW33<sup>[18]</sup>, 其前身质粒 PRW325 上的 bla 基因已被处理失活。把重组质粒转化到大肠杆菌所用的方法为氯化钙热激法<sup>[19]</sup>。质粒 DNA 以氯化铯密度梯度离心法提纯<sup>[20]</sup>。把菌株 5/B 和 569/H 的 penPC 基因带入枯草杆菌的质粒载体为 PRWM3, 这是质粒 PUB110 的衍生物, 不过其前身上的 EcoRI 位点被破坏, Pvu II 位点到 BamHI 位点之间的一段 250bp 的片段被去除。枯草杆菌的转化和其质粒的纯化按文献[17]和[15]的方法进行。

### 试剂来源

所有的限制性内切酶和其他 DNA 修饰酶类都是从 New England Biolabs 和 Bethesda Research Labs. 购得, 酶促反应条件由供给者提供。BamHI Linker 由 New England Biolabs 购得, 将其与 penPC 基因的非粘性末端相连接时所用的量为 50 倍于 penPC 基因片段(Mol/Mol)。蛋白质分子量系列标准物由 Bethesda Research Labs 购得。

### DNA 序列分析技术

将分析的基因分段克隆到噬菌体 M13 后, 沿用 Sanger<sup>[21]</sup> 的双脱氧核糖酸终链法进行序列分析。

### DNA 体外缺口复制和 DNA 杂交

用限制性内切酶 ClaI 切下质粒 PRWY22 上的一段 1.8kb 的菌株 569/H 的 penPC 基因片段作为探测 5/BpenPC 的探针。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 用作为放射性标记物。整个体外缺口复制过程基本上采用 Davis 的方法<sup>[22]</sup>, 不过 DNA 酶 I 的用量仅为 0.0002 $\mu$ g/ $\mu$ gDNA。复制好的 DNA 探针反应混合液流过一根 1ml 的 Sepharose 4B 的凝胶过滤柱进行纯化。DNA 杂交采用 Southern 的方法<sup>[23]</sup>, 杂交的条件为 17℃, 并轻微振荡 42 小时。

### 青霉素酶的测定, 抗体的制备及聚丙烯酰胺凝胶电泳

青霉素酶活力的定量测定使用的是 Sargent<sup>[24]</sup>的方法, 1 活力单位(1u)表示在 30℃, 1 小时内水解 1μmol 的苜青霉素的酶量。该酶类的定性分析采用文献<sup>[25]</sup>的方法在培养平板上进行。青霉素酶总量及分泌出的胞外酶的测定, 抗体的制备, 蛋白质的免疫沉淀以及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳均按文章<sup>[18,26]</sup>所述方法进行。

## 结 果

### 克 隆

腊样芽孢杆菌 5/B 的染色体 DNA 经限制性内切酶 ClaI 切割后, 与被同一种酶切割过的质粒 PRW33 相连接。重组 DNA 转化到大肠杆菌后, 将大肠杆菌涂布在含有氨苄霉素的平板上, 只有一个抗氨苄霉素的克隆出现, 经检验, 这个单菌落同时也抗四环素和氯霉素。从中提取到的重组质粒, 叫做 PRWY 200。限制性内切酶图谱标明了这个较大的质粒由 4.6 kb 的 PRW33 和 9.5kb 供体染色体 DNA 片段连接而成(图 1)。在 9.5kb 片段的中部还有一个

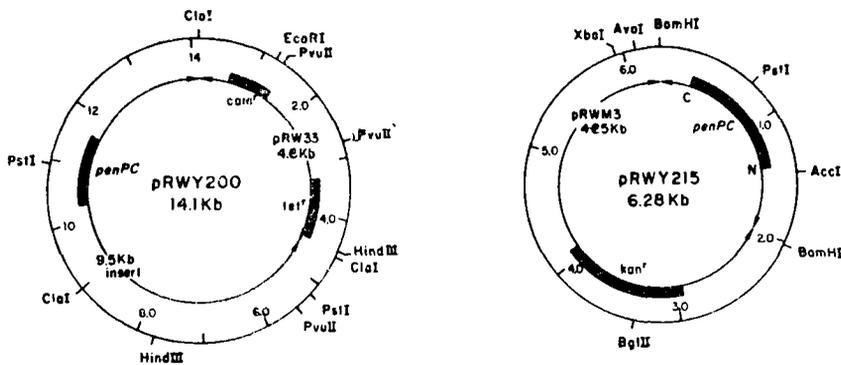


图 1

一个 ClaI 位点逃过了内切酶 ClaI 的切割。把大肠杆菌/PRWY200 培养到晚对数期时, 其青霉素酶的总活力为 1200u/ml。经过传代后, 其酶活逐渐下跌至 50—100u/ml, 此时质粒 PRWY200 的重转化也不能使其酶活恢复到最初的水平。这些酶活很低的子代一直能在三种抗生素混合平板上生长得很好。它们所含有的 PRWY200 的拷贝数似乎仍保持原样, 看来酶活力的下降不是由于这个原因所致。

### “Southern” DNA 杂交方法对 5/B 的 penPC 基因进行定位

经过免疫交叉试验, 发现用腊样芽孢杆菌 569/H 的 penPC 基因产物注射兔子所得的相应抗体能与 5/B 的 β-内酰胺酶 I 发生强烈的交叉反应。我们认为这两种酶的一级结构有着高度的同源性, 由此推断出二者基因的 DNA 结构有着相应的同源性。于是我们从质粒 PRWY22 上切下 1.8kb 的 569/H penPC 片段, 用它作为模板而制得了磷<sup>32</sup> 探针。带有 5/B penPC 的质粒 PRY200 被切成各种各样的片段后, 与探针进行杂交。杂交结果表明凡是带有 PstI 位点(位于 5.0kb 的 ClaI 亚片段中), 或被切在这个位点的片段都能与探针杂交。由此推断 penPC 基因是存在于 5.0kb 的 ClaI 亚片段中, 其中的 PstI 位点处于基因之中。我们切下了这个 5.0kb 的亚片段, 再克隆到大肠杆菌中去, 克隆子的酶活力仅为数百单位, 子代的酶活力也没有增加的趋势。

### 5/B 的 penPC 基因克隆到枯草杆菌中

进一步把 5.0kb 的 *Cla*I 片段切成 2.0kb 的 *Hinc* II 片段，其仍带有完整的 penPC 基因。我们先用 *Bam*HI Linker 接到该片段的两端，然后将其切成的粘性末端再与枯草杆菌的质粒载体 PRWM3 相连接。重组的 DNA 直接转化到枯草杆菌 BD170 中去。从氨苄霉素平板上到了六个抗性克隆，它们都含带有 2.0kb *Hinc* II 片段的质粒。从酶活力最高的一株克隆中得到的质粒，叫做 PRWY215。菌株 569/H 的 penPC 片段也被插到同样的质粒载体上，并转化到同样的受体菌中，所得的重组质粒叫做 PRWM5（基因片段的插入方向与 PRWY215 的也相同）。

### DNA 序列分析

基于以上的 DNA 杂交结果，我们从上述的 *Pst*I 位点着手进行 5/BpenPC 片段的序列分析。后来知道这个位点与 569/HpenPC 中的 *Pst*I 处于相同的位置，图2为 5/BpenPC 基因分

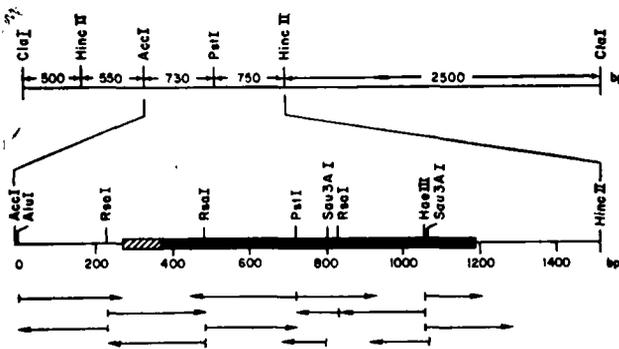


图 2

段进行的噬菌体 M13 克隆和序列分析的策略图。除了 C 端的一段因未能找到合适的克隆位点，只进行了一条链的分析。基因其他部分的两条互补链都得到了分析，图3示出了整个基因的 DNA 序列，并包括了启动子部分。由 DNA 的三联体密码而推算出的氨基酸序列也对应地标出。图中 5/B 和 569/H 的 penPC 基因序列的比较表明，可能的起读密码

ATG 都是紧紧挨在 Shine-Dalgarno 序列后面，核糖体结合位点与 ATG 之间这么小的空间似乎不利于转译的起始。二者的起读密码也有可能是方框画出的 TTG (图3)，这样它与 Shine-Dalgarno 部位末端有着 8—9 个核糖核酸的间隔。为方便起见，假设 TTG 是起读密码。我们将两个基因进行了对比(表 1)。5/B 的 penPC 基因共有 918 个可编码核糖核酸，而 569/H 的只有 912 个。这样 5/BpenPC 基因直接产物比 569/H 的多两个氨基酸。两个基因的 DNA 序列共有 103 个核糖核酸是不相同的，约占总数的 11.3%；推算出的两条肽链共有的 42 个氨基酸是不相同的约占总氨基酸数的 13.8%。

### 5/BpenPC 基因在枯草杆菌中的表达

带有 5/BpenPC 基因的枯草杆菌 BD170/PRWY215 的青霉素酶活力约为 14000u/ml，几乎与这个基因的原发株的酶水平一致。培养 30 小时后，90% 以上的  $\beta$ -内酰胺酶 I 分泌出体外。在同批对照试验中，带有 569/H 的 penPC 基因的枯草杆菌 BD170/PRWM5 的酶活力仅为 7000u/ml，其基因的原发株的酶活力为 10000u/ml。也是 90% 以上分泌出胞外。我们分别从以上四种培养上清液中用抗体沉淀下各  $\beta$ -内酰胺酶 I 的胞外酶进行凝胶电泳分子量测定。结果由(图 4)所示：569/H 原发株的胞外酶比枯草杆菌克隆的胞外酶大一些。而 5/B 原发株和其枯草杆菌克隆的胞外酶似乎一样大。





总的来说,腊样芽孢杆菌 5/B 和 569/H 的  $\beta$ -内酰胺酶 I 很相似,二者的基因 DNA 序列仅为 11.3% 之差,基因产物的氨基酸序列仅为 13.8% 之差,这些差异并不使得两个酶的催化活性、底物专一性,及酶的分泌性有明显的差异。我们认为二者的情况下,其基因的转译起读密码都是 TTG。金黄色葡萄球菌 *pc1* 的  $\beta$ -内酰胺酶<sup>[2,1]</sup>和核酸酶的基因<sup>[28]</sup>就有着同样的情况。从图 3 可以看出划方框的 ATG 靠 Shine-Dalgarno 序列太近了,不太可能作为起读密码。如果 TTG 确是起读密码,5/BpenPC 基因的直接产物便是一段 306 个氨基酸所组成的肽链,比 569/H 多了两个氨基酸残基,其中多出的一个氨基酸位于肽链 C 端的最后一位,另一个是从 C 端读起的第三十个氨基酸。

比较两个基因的 C 端,发现该部分的 DNA 序列有较大的不同,编码的三十个氨基酸中,有十五个氨基酸是互不相同的。曾有这样的假说:既,可分泌蛋白质肽链的 C 端的氨基酸组成对蛋白质穿越细胞膜没有多大的影响,除非这一部分的肽链极性太强而穿不过细胞膜,或是非极性太强而结合在膜上。我们的结果与这一假说是一致的。从菌株 5/B 的  $\beta$ -内酰胺酶 I 的一级结构可以看出它完全是属于 A 类的  $\beta$ -内酰胺酶<sup>[4]</sup>。

5/BpenPC 基因的信号多肽序列与 569/H 的在结构上有些不同,不过在功能上很相似。我们注意到两个基因产物的 N 端部分都有四个极性氨基酸(这是革氏阳性菌可分泌蛋白质的信号多肽的特点)<sup>[29]</sup>。不象地衣芽孢杆菌 749/C 中的 *penP* 基因的信号多肽<sup>[8]</sup>,两个 *penPC* 基因的信号多肽中的半胱氨酸都不能与细胞膜结合, [<sup>3</sup>H]-棕榈酸盐的同位素标记试验表明以上两个基因的直接产物都不是脂蛋白。另外,5/BpenPC 的直接产物中的第 24 位缬氨酸和第 29 位甘氨酸取代了 569/H 的相应的两个谷氨酸,使得 5/BpenPC 的信号多肽的非极性片段大大长于 569/H 的相应部分。这个不同可能造成了两个  $\beta$ -内酰胺酶 I 最后受到细胞加工的情况有所不同。两个基因所编码的直接蛋白质产物的大小相差甚微,然而从凝胶电泳分子量测定结果发现 5/B $\beta$ -内酰胺酶 I 的胞外酶比 569/H 的相应产物要大几千个道尔顿。比较两个基因的枯草杆菌的克隆,我们发现 5/B 的克隆的胞外酶电泳只显出一条带,而 569/H 的却显出两条带,两种 569/H 胞外酶都比 5/B 的小。我们认为这是由于两种  $\beta$ -内酰胺酶 I 的肽链结构有所不同,而造成了二者被宿主细胞的蛋白酶加工成胞外酶的断裂位点不一致的原因所致。5/B 这个酶的肽链上,从第 21 位苏氨酸到第 30 位丙氨酸之间有着几个潜在的断裂位点,而 569/H 的胞外酶则是从其基因直接产物的第 42~46 位氨基酸处被断裂而得(5)。从凝胶电泳上测得的 5/B 的胞外酶的分子量推算,似乎是比 569/H 的多了 15~20 个氨基酸。实际结果有待于进一步证实。

5/BpenPC 基因 N 端前面的调节部位也与 569/H 的相应部位有些不同。二者的启动子部位的“-10”和“-35”序列各有一个核甙酸相异(表 1)。

关于 Shine-Dalgarno 部位,由于 5/B 的比 569/H 的多了一个不互补的核甙酸,它与大肠杆菌核糖体的 16S rRNA 3' 端的 CCUCC 部位的互补性更差些。这样可能造成了 5/B 的 *penPC* 基因在转译水平上受阻,以致于在大肠杆菌中表达不好。相反,5/BpenPC 的 Shine-Dalgarno 部位与枯草杆菌的核糖体的相应结合部位互补(30),事实上这个基因在枯草杆菌中表达得很好。

5/BpenPC 基因终止密码后面的序列与 569/H 的相应序列很不相似(7)。在这一段 88bp 的序列中找不到明显的转录终止结构,很可能 5/BpenPC 本身不是一个独立的顺反子,而是一个多顺反子的一部分。

到目前为止,我们还不能解释为什么 5/BpenPC 的大肠杆菌克隆经传代后,  $\beta$ -内酰胺酶 I 的活力逐步地下降。而且, penPC 基因片段被重组到不同的质粒载体上,再转化到大肠杆菌后,其表达水平都大大低于大肠杆菌 RR<sub>1</sub>/PRWY200 的原始水平。而 5/BpenPC 的枯草杆菌克隆则不然,传代后的表达水平一直保持在原有的水平上,酶产物几乎是持续,不断地排出胞外。值得注意的是,5/B 的枯草杆菌克隆的产酶水平比 569/H 的高了一倍。对 5/B penPC 基因及其产物的研究,对探索应用这一类基因的信号多肽片断去引导其他的胞内酶分泌出胞外有着实际意义。

缩写符号说明:

bp—碱基对

kb—一千个碱基对

kd—一千个道尔顿单位

### 图 表 说 明

图 1、质粒 PRWY200 和 PRWY215 的限制性内切酶切点图谱

PRWY200 为大肠杆菌质粒,其带有三种抗药性基因,分别抗氯霉素(cam)、四环素(tet)、氨卞霉素(penPC)、其中 9.5kb 的 ClaI 切割片段靠霰弹效应重组到质粒载体 PRW33 上。PRWY215 是枯草杆菌的质粒,其带有两种抗药性基因,分别抗卡那霉素(Kan),和氨卞霉素(penPC)

图 2、PRWY200 上带 5/BpenPC 基因的一段 5.0kb 的 ClaI 切割片段的酶切图谱以及 penPC 基因的 DNA 序列分析策略图

图中 AccI-Hinc II 这一片段被放大,以便标出基因上详细的酶切位点。在结构基因序列的粗条部分中,粗黑条表示编码胞外酶部分,斜格条表示编码信号多肽部分。DNA 序列分析过程中,为分段进行噬菌体 M13 克隆及双脱氧核糖核酸终链法分析,片段被切割成许多亚片段。图中的箭头表示这些亚片段的长度及分段分析所采用的方向。

图 3、腊样芽孢杆菌 5/B 和 569/H 的 penPC 基因的核糖核酸和氨基酸序列比较图

图中以大写字母排出的连续序列表示出 5/BpenPC 基因的 DNA 序列,569/H 基因序列中与其不同的核糖核酸被标在相对应的位置的下方,相同部分不另标出。两个基因的终止密码的后面部分完全不同,只标出了 5/B 的该段序列。从 5/BpenPC 基因推算出的氨基酸序列以斜体字母标在相应的核糖核酸密码上方。标在 5/B 氨基酸序列上方的一些氨基酸为 569/H 的相异之处,其与 5/B 的相同部分不另标出。5/B 核糖核酸序列中下方带有小点的部分表示其在 569/H 的相应序列中不存在。核糖核酸序列中的核糖体结合部位(即 Shine-Dalgarno 部位)用 S.D. 标在上方来表示。对照文献<sup>[1]</sup>所找到的“-10”和“-35”启动子部位用虚线标在上方表示。图中的唯一的\*表示 569/H 基因中该处的核糖核酸为 C<sup>[1]</sup> 或 T<sup>[6]</sup>。

图 4、各种  $\beta$ -内酰胺酶 I 分泌产物的比较

聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中,(栏1)腊样芽孢杆菌 5/B 的产物(33,500 道尔顿);(栏2)腊样芽孢杆菌 569/H 的产物(31,000 道尔顿);(栏3)枯草杆菌 BD170/PRWY215 的产物(33,500 道尔顿);(栏4)枯草杆菌 BD170/PRWM5 的产物分别为(30,700 和 30,000 道尔顿)。所有样品都是分别从培养了 30 小时的培养上清液中经 569/H 的  $\beta$ -内酰胺酶 I 的抗体沉淀而得。这些免疫沉淀物经纯化处理,溶解于 SDS-Lammeli 缓冲液后,加到含有 8M 尿素的 15~22% 梯度聚丙烯酰胺凝胶上进行分子量电泳分析,电泳后的凝胶以银染色法染色,显出蛋白质色带。蛋白质标准分子量参照物为:细胞色素 C(12,300 道尔顿); $\beta$ -乳球蛋白(18,400 道尔顿);胰凝乳蛋白酶原(25,700 道尔顿);卵清蛋白(43,000 道尔顿);和牛血清蛋白(68,000 道尔顿)。

表1 腊样芽孢杆菌 5/B 和 penPC569/H 基因的特征比较

|                                  | 5/B penPC        | 569/H penPC      |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| 编码肽链的核甙酸总数*                      | 918              | 912              |
| 氨基酸的总数*                          | 306              | 304              |
| 可能的启动子部位<br>(- '35')<br>(- '10') | TTATTA<br>GATAAA | TTGTTA<br>TATAAA |
| Shine-Dalgarno 部位                | GAAAG            | GGAAG            |

\* 二者情况下, 表中的数字均是在假定 TTG 为起读密码的情况下计算的, 终止密码没有算在内。表中两个基因的调节部位中, 由短横线标出两者之间不同的核甙酸排列。

## 参 考 文 献

- [1] Pollock, M.R.(1963) in *The Bacteria*, Vol.4. Gunsalus, I. C. and Stanier, R.Y. Eds. PP. 121—177 Academic press, New York.
- [2] Abraham, E. P. and Waley, S. G. (1979) in *Beta-lactamases*. Hamilton-Miller, J.M.T. and Smith, J.T., Eds. pp. 311-338 Academic Press, London.
- [3] Pollock, M.R. (1956) *J. Gen. Microbiol.* 15, 154—169.
- [4] Ambler, R.P. (1980) *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* 289 321—331.
- [5] Thatcher, D.R. (1975) *Biochem. J.* 147, 313—326.
- [6] Mézes, P. S. F., Yang, Y. Q., Hussain, M. and Lampen, J. O. (1983) *FEBS Lett.* 161, 195—200.
- [7] Sloma, A. and Gross, M. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 4997—5004.
- [8] Nielsen, J. B. K. and Lampen, J.O. (1983) *Biochemistry* 22, 4652—4656.
- [9] Sneath, P. (1955) *J. Gen. Microbiol.* 13, 561—568.
- [10] Connolly, A. K. and Waley, S. G. (1983) *Biochemistry* 22, 4647—4651.
- [11] Kogut, M., Pollock, M.R., and Tridgell, E. J. (1956). *Biochem. J.* 62, 391—403.
- [12] Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) *J. Mol. Biol.* 41, 459—472.
- [13] Dubnau, D., Goldthwaite, C., Smith, I. and Marmur, J. (1967) *J. Mol. Biol.* 27, 163—185.
- [14] Pollock, M. R. (1965) *Biochem. J.* 94, 666—675.
- [15] Gryczan, T. J., Contente, S. and Dubnau, D. (1978) *J. Bacteriol.* 134, 318—329.
- [16] Miller, J. H. (1972) in *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [17] Dubnau, D. and Davidoff-Abelson, R. (1971) *J. Mol. Biol.* 56, 209—221.
- [18] Mézes, P. S. F., Wang, W., Yeh, E. C. H. and Lampen, J. O. (1983) *J.*

- Biol. Chem. 258, 11211—11218.
- [19] Lederberg, E. and Cohen, S. (1974) *J. Bacteriol.* 119, 1072—1074.
- [20] Clewell, D. and Helinski, D. R. (1972) *J. Bacteriol.* 110, 1135—1146.
- [21] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463—5467.
- [22] Davis, R.W., Botstein\* D. and Roth, J.R. (1980) in *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [23] Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503—517.
- [24] Sargent, , M. G. (1968) *J. Bacteriol.* 95, 1493—1494.
- [25] Sherratt, D. J. and Collins, J.F. (1973) *J. Gen. Microbiol.* 76, 217—230.
- [26] Izui, K., Nielsen, J. B. K., Caulfield, M.P. and Lampen, J.O. (1980) *Biochemistry* 19, 1882—1886.
- [27] McLaughlin, J.R., Murray, C. L., and Rabinowitz, J. C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11283—11291.
- [28] Shortle, D. (1983) *Gene* 22, 181—189.
- [29] Lampen, J.O., Wang, W., Mezes, P. S. F. and Yang, Y. Q. (1984) in *Genetics and Technology of Bacilli*. Hoch, J.A. and Ganesan, A.T. Eds pp. 000—000 Academic Press, New York.
- [30] Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) *Nature* 254, 34—38.

## Molecular Cloning and Expression of One of the $\beta$ -lactamase Genes

*Wang Wu*

### ABSTRACT

The  $\beta$ -lactamases of *Bacillus cereus* have attracted interest because they are secreted efficiently, multiple enzymes are frequently present, and regulation has unusual features. We have cloned and sequenced the  $\beta$ -lactamase I gene, penPC, of *B. cereus* 5/B and have compared it with the corresponding penPC gene from strain 569/H. The inferred primary structures and translation product molecular weights from the two gene products are generally similar but significant differences occur in the signal peptide and COOH-terminal regions. The 5/B enzyme is produced at a low level in *Escherichia coli* but it is formed in large amounts in *Bacillus subtilis* and greater than 90% is secreted to the external medium.