文章编号:1673-1689(2005)03-0044-04

带自身启动子的 *bgaB* 基因在枯草芽孢杆菌中的表达

傅晓燕， 陈 卫， 夏 雨， 张 灏
(江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要:将来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的启动子连同 β-半乳糖苷酶 *bgaB* 基因经 PCR 扩增后,连接在 T 载体上,再取代枯草杆菌载体 pZ01-*bgaB* 的启动子,将其在枯草杆菌宿主 WB600 中表达. 经摇瓶发酵 20 h,得到乳糖酶活力 6.37 U/mL,比活力 3.814 U/mg,SDS-PAGE 电泳显示有明显重组蛋白质条带. 证明了嗜热脂肪芽孢杆菌来源的启动子在枯草杆菌中是完全适用的.

关键词:嗜热脂肪芽孢杆菌;启动子;枯草芽孢杆菌
中图分类号:Q 78 **文献标识码**:A

The Expression of *bgaB* Gene with its Promoter in *Bacillus subtilis*

FU Xiao-yan, CHEN Wei, XIA Yu, ZHANG Hao
(The Key Laboratery of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The promoter and gene sequence from *Bacillus stearothermophilus* were amplified through PCR, and cloned into T-vector. Then *bgaB* gene and its regulatory sequence were constructed into *B. subtilis* vector pZ01-*bgaB* to replace the original promcter. After culturing for 20 h, thermostable β-galactosidase activity of 6.37 U/mL, and specific activity of 3.814 U/mg were obtained. The target protein was identified at about 70 kD in SDS-PAGE. The result suggested that the *bgaB* promoter from *B. stearothermophilus* was effective in *B. subtilis*.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*; promoter; *Bacillus subtilis*

β-半乳糖苷酶(E. C. 2. 3. 1. 23)俗称乳糖酶,因能水解 β-半乳糖苷键而具有重要的工业用途,如在乳品生产中水解乳糖,生产低乳糖牛奶;在分子生物学中,由于它有明显的显色反应,常用做报告或标记基因. 目前,大肠杆菌来源的乳糖酶 lacZ 基因研究的最多、最透彻,但是来源于嗜热微生物的乳糖酶基因研究并不是很多. 近年来,高温乳糖酶基因研究的报道来源有 *Thermus sp.* A4[1],*Bacillus coagulans*[2],*Pyrococcus woesei*[3],它们的最适温度很高,达到 70～90 ℃.

作者所在实验室在研究嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilis*)来源的乳糖酶基因(*bgaB* 编码)有一定的基础,在大肠杆菌和枯草杆菌系统中均尝试过表达,前人研究表明,该基因在枯草芽孢杆菌系统中表达情况较好. 考虑到嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌同属革兰氏阳性菌,亲缘关系较近,有报道谷氨酸棒状杆菌[4]来源的启动子在枯草杆菌中也适用. 所以作者将 *Bacillus stearothermophilis* 中启动子连同 β-半乳糖苷酶 *bgaB* 基因用 PCR 的方法扩增出来,尝试在枯草杆菌系统中进行表达.

收稿日期:2004-09-16; **修回日期**:2005-02-14
作者简介:傅晓燕(1980-),女,江苏盐城人,食品科学与工程硕士研究生.
万方数据

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌种　嗜热脂肪芽孢杆菌 *Bacillus stearothermophilis* ATCC8005，大肠杆菌克隆宿主 TGI（*supE hsd*Δ5*thi*Δ(*lac-proAB*) *F′* [*tra*D36*pro*AB$^+$ *lac*I^q*lacZ*Δ*M*15]，作者所在实验室保存；枯草芽孢杆菌表达宿主 WB600（*his* Δ*npr*B Δ*npr*E18 Δ*apr*E Δ*epr*Δ*bpf*Δmpr），中科院生化所袁中一实验室馈赠.

1.1.2　质粒　质粒 pZ01-*bgaB*，作者所在实验室构建并保存；pUm-T 载体购自上海申能博彩生物公司.

1.1.3　化学试剂　各种限制性内切酶，T4 连接酶，T4 DNA Polymerase，Ex Taq 聚合酶购自 TaKaRa 公司；MBI DNA Ladder Mix：购自上海生工生物公司；其余试剂均为进口或国产分析纯.

1.1.4　培养基　LB 培养基：见分子克隆实验指南 III[5]；抗生素含量：用于培养含有 Amp^r 质粒的 *E. coli* 时，质量浓度为 50 μg/mL；用于培养含有 Km^r 质粒的 *B. subtilis* 时，质量浓度为 50 μg/mL；LB 淀粉培养基：在 LB 培养基上添加 1 g/L 淀粉.

1.2　实验方法

1.2.1　嗜热脂肪芽孢杆菌基因组 DNA 的提取　见文献[6].

1.2.2　质粒 DNA 的操作　质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化、电泳等操作见文献[5]，胶回收操作按照试剂盒说明书.

1.2.3　枯草芽孢杆菌的转化　采用化学感受态法，转化方法见文献[7].

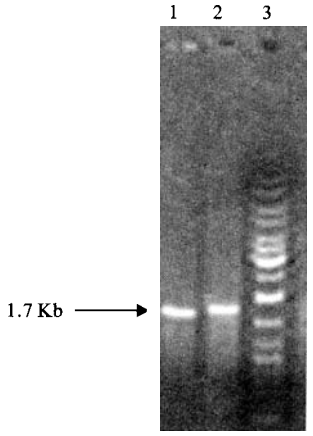
1.2.4　β-半乳糖苷酶酶活测定　β-半乳糖苷酶的酶活测定方法为吉斯特—布洛卡兹法[8]，以 ONPG 为底物，在 55 ℃测定酶活. 酶活单位定义为 1 min 内水解底物 ONPG 产生 ONP 的微摩尔数.

1.2.5　蛋白质含量测定和 SDS-PAGE 凝胶电泳　蛋白质含量测定按 Folin-酚法[9]，SDS-PAGE 电泳见文献[5]，分离胶质量浓度为 10 g/L.

2　实验结果

2.1　含启动子的 *bgaB* 基因的 PCR 扩增和 T/A 克隆

根据 Hiruhisa Hirata 报道[10]设计上游引物：5′-GAATTCTTCACGATGTTCGACAG -3′（下划线为 *Eco*RI 位点，）；下游引物：5′-TATGGTACAAATTCCTCAAC-3′. 以提取的 *B. stearothermophilis* 基因组 DNA 为模板，Ex Taq 聚合酶扩增得到 1.7 Kb 的片段，PCR 扩增条件为：1) 94 ℃预变性 5 min；2) 94 ℃变性 50 s，48 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 110 s，30 个循环；3)72 ℃延伸 10 min. 电泳图谱见图 1.

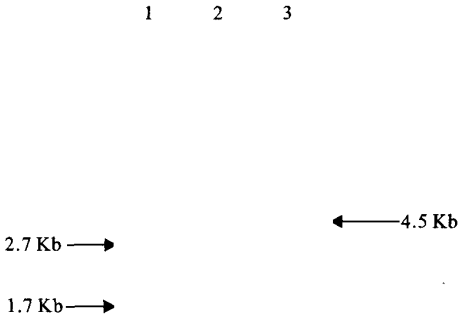


1,2. 以基因组为模板的 PCR 扩增产物；3. MBI Ladder Mix (10000,8000,6000,5000,4000,3500,3000,2500,2000,1500,1200,1031,900)

图 1　从启动子到 *bgaB* 基因序列的 PCR 扩增

Fig. 1　PCR amplification of promoter and *bgaB*

胶回收 PCR 产物和 pUm-T 载体，16 ℃连接过夜，转化大肠杆菌感受态细胞 TGI，通过蓝白斑筛选，挑转化子抽提质粒，酶切鉴定，见图 2.



1. MBI Ladder Mix；2. 重组质粒 pUT-E *Pst*I 单酶切；3. 重组质粒 pUT-E *Eco*RI 单酶切

图 2　重组质粒 pUT-E 酶切鉴定图谱

Fig. 2　Identification of recombinant plasmid pUT-E

将质粒 pUT-E 送公司测序，T7 启动子测序引物一个反应便可得知 *Bacillus stearothermophilis* 启动子序列，测序结果和 Hiruhisa Hirata 报道完全一致，没有碱基突变.

万方数据

2.2 质粒 pF01-*bgaB* 的构建和枯草杆菌宿主的转化

*Eco*RI 和 *Eco*RV 双酶切载体 pZ01-*bgaB*，得到3个片段，取含有枯草杆菌序列和抗性基因 4.2 Kb 的片段. *Eco*RI 和 *Eco*RV 双酶切 pUT-E 质粒，胶回收 1.7 Kb 的片段，将2个片段连接，转化枯草杆菌宿主 WB600. 所得菌株命名为 WB600/pF01-*bgaB*. 整个构建流程见图3.

同时 *Eco*RI 和 *Kpn* I 酶切 pZ01-*bgaB*，也得到3个片段，取 5.7 Kb 片段，该片段含有完整的枯草杆菌序列和 *bgaB* 基因，但是无启动子序列. 用 T4 DNA 聚合酶补平，连接，转化枯草杆菌 WB600. 所得菌株命名为 WB600/ pC-*bgaB*，该菌株作为 WB600/pF01-*bgaB* 的对照，它含有 *bgaB* 基因，但不含启动序列.

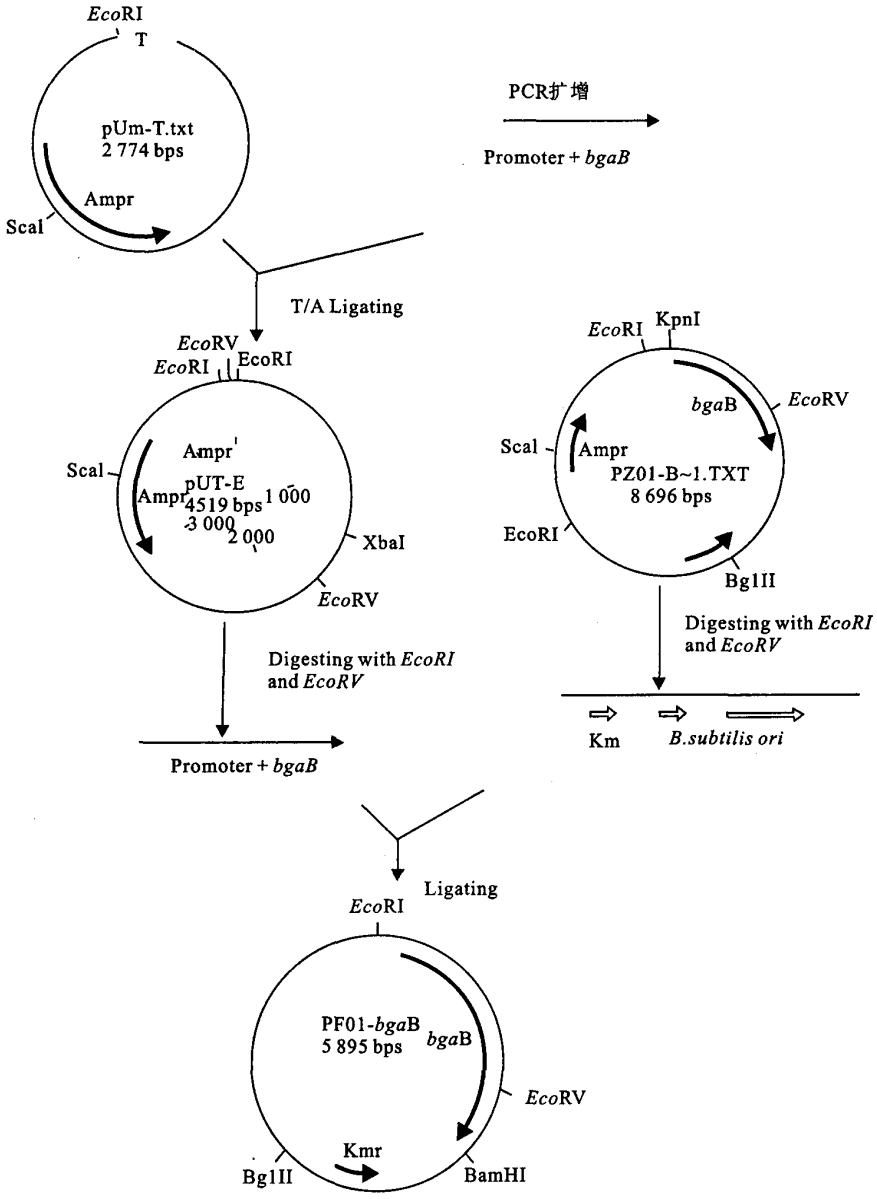


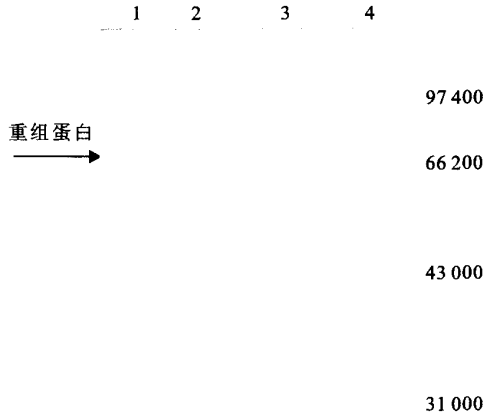
图3 重组质粒 pF01-*bgaB* 的构建流程

Fig. 3 Construction process of the recombinant plasmid pF01-*bgaB*

2.3 重组菌株的酶活测定和蛋白质电泳

重组菌株 WB600/pF01-*bgaB* 中的启动子来源于嗜热脂肪芽孢杆菌，不需要诱导，为组成型启动子. 挑单菌落于3 mL LB 中培养过夜，以1%的接种量接种于 50 mL 的 LB 淀粉培养基，37 ℃，200 r/min 培养 20 h. 离心菌体后超声波破胞，粗酶活为

6.37 U/mL，蛋白质质量浓度为 1.67 mg/mL，比酶活为 3.814 U/mg. 而空菌株 WB600 检测不到酶活. 同时取粗酶液进行 SDS-PAGE 电泳，从图 4 中可以看出重组菌株 WB600/pF01-*bgaB* 在相对分子质量 70 000 处有蛋白质条带，这和以前在枯草杆菌中表达该蛋白质的大小是一致的，而空菌株没有蛋白质表达.



1. WB600/pMA5-*bgaB*（本实验室构建）初步纯化酶液；2. 重组菌株 WB600/pF01-*bgaB* 粗酶液；3. WB600/ pC-*bgaB* 粗酶液；4. 标准相对分子质量蛋白质

图 4　重组菌株 WB600/pF01-*bgaB* 的 SDS-PAGE 蛋白质电泳

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of WB600/pF01-*bgaB*

3　讨　论

作者用 PCR 的方法从 *B. stearothermophilis* 的基因组中扩增出表达调控序列-启动子，并把它构建到枯草芽孢杆菌载体中，得到的重组菌株具有较高的乳糖酶活力，SDS-PAGE 电泳证明了该菌株有蛋白质的表达，说明 *B. stearothermophilis* 来源的启动子在枯草芽孢杆菌中是完全适用的. 据 Hirohisa Hirata[10] 报道，该启动子的-35 区为 TTGACA，-10 区为 TAATTT，其中-35 区的序列和枯草杆菌 RNA 聚合酶 σ^{43} 因子结合序列是完全一致的，-10 区序列和枯草杆菌 σ^{43} 因子结合序列"TATAAT"比较接近，而两者距离 17 bp，也是很多枯草杆菌 RNA 聚合酶所倾向的. 启动子-35 区以上的序列富含有 A 和 T 碱基，这对于转录是很有帮助的，所有这些都可以从理论上解释该启动子在枯草杆菌系统中适用.

B. stearothermophilus 和 *B. subtilis* 的启动子有类似之处，这在何笑松[11] 的研究中有所反应. 他利用启动子探测载体 pPL703 分离出 *B. stearothermophilus* CUZ1 基因组中启动子片段，然后将其转化到 *B. subtilis* 宿主中，发现启动子序列插入到质粒中，使得原生质体转化效率提高了 10 倍. 关于枯草芽孢杆菌的很多研究证明，质粒转化 *B. subtilis* 感受态时，一般效率是很低的，但如果质粒上带有与受体染色体或受体细胞内原有质粒同源的片段，则能提高转化效率. 这说明 *B. stearothermophilus* 启动子和 *B. subtilis* 的染色体有一定的同源性. 同时 Takagi[12] 和 Sukagashi[13] 在对 *B. stearothermophilus* 中性蛋白酶和淀粉酶基因的结构研究时，也曾注意到这种相似性. 但高温细菌启动子的核苷酸序列研究资料还不是很多，需要进一步积累资料，才能将它们和常温菌的启动子做系统的比较.

与实验室以前构建的重组枯草杆菌 WB600/p201-*bgaB* 相比，同样摇瓶培养 20 h，酶活为11.128 U/mL，比酶活为 5.39 U/mg，WB600/pF01-*bgaB* 在表达量上稍稍逊色，这和我们的初衷有些违背. 推测原因在于 *bgaB* 启动子毕竟为一个异源的启动子，而质粒 p201 启动子 p43 本身就来源于枯草杆菌，且为重叠启动子（生长期和静止期分别起作用）. 当然两个载体上序列的一些差异，如有效的转录终止序列，也有可能对表达产生影响.

参考文献：

[1] Ohtus N, Motoshima H, Goto K, *et al*. Thermostable β-galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus sp*. A4: enzyme purification and characterization and gene cloning and sequencing[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1998, 62(8): 1539—1549.

[2] Batra N, Singh J, Banwrjee U C, *et al*. Production and characterization of a thermostabgle beta-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 2002, 36(1): 1—6.

[3] Daabrowski S, Sobieeska G, Matsuzawa J. Cloning, expression and purification of the His(6)-tagged thermostable β-galactosidase from Pyrococcus woesei in *E. coli* and some properties of the isolated enzyme [J]. **Protein Expr Purif**, 2000, 19(1): 107—112.

（下转第 51 页）

万方数据

表 5　E-3519 及参考株的抗菌谱

Tab. 5　Antiogram of E-3519 and reference strains

抗菌谱	E-3519	ATCC 14539	ATCC 43537	ATCC 14538
枯草杆菌(501)	−	−	±	+
大肠杆菌(103)	−	−	−	±
金色葡萄球菌(209)	−	−	±	+
白色假丝酵母(477)	−	−	−	−
黑曲霉	−	−	−	−
产黄青霉	−	−	−	−
分枝杆菌(617)	−	−	−	−

2) 目前国外关于放线菌的分类是采用遗传学手段,用指纹图谱来鉴别菌种的归属,而我国对放线菌的分类仍采用经典的形态学方法. 作者对阿卡波糖生产菌 E-3519 的鉴别主要采用形态学方法. 根据 E-3519 菌主要生化特征及形态学特征初步认为与 ATCC14539 相似,故命为 *Actinoplanes utahensis var.*(犹他游动放线菌变种).

3) 阿卡波糖是治疗Ⅱ型糖尿病的首选药物之一,由德国拜耳开发成功,于 20 世纪 90 年代先后在欧洲多国、美国、中国等几十个国家销售. 菌株 E-3519 的获得及进一步的研究开发成功,有利于阿卡波糖生产实现国产化.

参考文献:

[1] 蒋伯诚. 轻症糖尿病与胰岛素增敏剂和 α-糖苷酶抑制剂[J]. 国外医药,1998,19(2):100−104.

[2] Clissod S P,Clive Edwards. A prelimary review of its phamarcodynamic and phamarcokinetic properties and thenarpeutic potential[J]. **Drugs**,1998, 35:214−243.

[3] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994. 352−364.

[4] Werner Frommer, Wuppertal, Horst Gericke, *et al*. Amino sugars and their use in improving the meat: fat ratio in animals[P]. 美国专利:USP 4065557. 1977-12-27.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 47 页)

[4] Micoslav P, Gunther M, Wolfgang W. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *E. coli Streptomyces* lividans and *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Biotech**, 2003,104: 325−334.

[5] J 萨姆布鲁克, D 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂译, 北京: 科学出版社,2002.

[6] Colinrh. Simon M C. Molecular Biological Method for Bacillus [M]. England:John Wiley &Sons Ltd, 1990.

[7] Yasbin R E, Wilson G A, Young F E. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells[J]. **J Bacteriol**, 1975, 121:296−304.

[8] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M],钱嘉译. 北京:中国轻工业出版社,1990.

[9] 厉朝龙. 生物化学与分子生物学实验技术[M], 杭州:浙江大学出版社,2000.

[10] Hiruhisa Hirata, Tsuyoshi F, Shiji Negoro. Structure of a β-galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1986, 166:722−727.

[11] 何笑松,沈仁权,盛祖嘉. 嗜热脂肪芽孢杆菌启动子克隆载体 pFDC4 和表达载体 pFDC11 的构建. 遗传学报[J]. 1990,17(4):313−320.

[12] Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka, Shuichi Aiba. Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*[J]. **J Bacteriol**, 1985,163(3):824−831.

[13] Norihiro T,Sumiko IR,Takuji S,*et al*. Efficient synthesis and secretion of a thermophilic α-amylase by protein-producing Bacillus brevis 47 Carrying the *B. stearothermophilus* amylase gene[J]. **J Bacteriol**,1985,164(3):1182−1187.

(责任编辑:杨 萌,李春丽)

万方数据