

利用短短小芽孢杆菌启动子和信号肽编码序列构建 穿梭分泌表达载体

张晓舟, 闫 新, 崔中利, 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 :以短短小芽孢杆菌 B15 的总 DNA 为模板,利用 PCR 技术克隆到其细胞壁蛋白基因串联启动子和信号肽编码序列,测序分析后提交 GenBank,登录号为 AY956423。重新设计引物扩增该片段并在 PCR 产物两侧引入 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点,将 PCR 产物双酶切后克隆至穿梭载体 pP43NMK 的相应位点构建分泌表达载体 pP15MK,插入片段置于该载体中 *mpd* 基因的上游,并使信号肽编码序列与去除了自身信号肽编码序列的 *mpd* 基因阅读框恰好融合。将 pP15MK 导入枯草杆菌构建表达菌株 1A751(pP15MK),在短短小芽孢杆菌启动子和信号肽元件的带动下,*mpd* 基因能够在表达菌株的对数生长期和稳定期持续性高效分泌表达,表达产物结合在细胞膜上,发酵液在 48h 酶活达到最高值 7.79U/mL,是出发菌株邻单胞菌 M6 表达量的 8.1 倍。

关键词 :短短小芽孢杆菌;启动子;信号肽;分泌表达;枯草芽孢杆菌

中图分类号 :Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2006)04-0526-05

本实验室分离到一株能将剧毒农药甲基对硫磷水解为对硝基苯酚的菌株邻单胞菌(*Plesiomonas* sp.) M6,从其染色体 DNA 中成功克隆到了一个新的甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*(GenBank Accession No. AF338729)^[1]并用 T7 启动子带动在大肠杆菌中得到了重组表达^[2]。甲基对硫磷水解酶(Methyl Parathion Hydrolase, MPH)能够广谱性地降解多种有机磷类农药,这无疑为农产品和环境中的农药残留的消除,保护生态环境和人畜健康提供了很好的材料与方法。但是由于革兰氏阴性菌细胞壁复杂,具有双层膜结构,其分泌的水解酶往往在信号肽的引导下跨越第一层膜后而滞留在周质空间,严重影响了其与农药底物的接触和降解过程^[3]。另一方面,由于革兰氏阴性菌不具有特殊的休眠结构,导致其发酵产品的货架期很短,或者需要进行昂贵的低温保存。以上因素都极大地限制了其在生产中的大规模应用。

芽孢杆菌为革兰氏阳性细菌,是传统的工业生产菌,其分泌蛋白能力强,细胞壁结构简单且不含内毒素,具有临床和环境方面的安全性^[4,5]。芽孢杆菌可以形成抗逆性很强的芽孢,可以大大提高其环境适应能力和与土著微生物的竞争能力,同时也可以

很好的延长其发酵产品的货架期。将 *mpd* 基因在芽孢杆菌中表达,将解决其在原有宿主菌中的一些问题,为其大规模生产和应用,保护环境和人民健康发挥重大作用。

mpd 基因自身的启动子不能够带动其在枯草杆菌中表达^[6]。本研究利用 PCR 技术从短短小芽孢杆菌 B15^[7]总 DNA 中扩增到其细胞壁蛋白基因(*cwp*)串联强启动子和信号肽编码序列,构建了 *mpd* 基因的穿梭分泌表达载体。利用该表达载体初步实现了 *mpd* 基因在枯草杆菌中的分泌表达,其表达量远远高于出发菌株。本文是国内外首次报道短短小芽孢杆菌 *cwp* 基因启动子和信号肽元件在枯草杆菌中的应用,同时也为进一步建立短短小芽孢杆菌高效分泌表达系统奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和短短小芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) B15^[7]为本实验室保存,枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) 1A751^[8]为美国芽孢杆菌保藏中心赠送,该菌株缺失两个主要蛋白酶基因 *aprA* 和 *nprE*,T 载体(pMD18-T)购自 TaKaRa

基金项目 :国家自然科学基金(30300005;40471073);国家“863 计划”(2004246070;2004214102);国家科技攻关项目(2005BA516A02-01;2005BA516A02-02)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396314;E-mail dsp@njau.edu.cn

作者简介 张晓舟(1978-)男,山东莱州人,博士研究生,主要从事枯草芽孢杆菌分子克隆及分泌表达系统的研究。E-mail xiaozhouzhang@hotmail.com;闫 新为本文并列第一作者。

收稿日期 2005-10-14;接受日期 2005-11-21;修回日期 2005-12-22

公司, *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体 pP43NMK^[6] 为本实验室构建和保存。

1.1.2 酶和引物 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 *Taq* 酶均为 TaKaRa 公司产品, 引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.1.3 培养基 T₂ 培养基, Superrich 培养基和 LB 培养基见参考文献 [9~11]。

1.2 短短小芽孢杆菌 B15 总 DNA 的提取

挑取短短小芽孢杆菌 B15 的单菌落接种至 3mL T₂ 培养基中, 37℃ 摇床振荡培养过夜, 次日收集菌体, 参照文献 [12] 提取总 DNA。

1.3 分子操作

大肠杆菌普通感受态细胞的制备、质粒的提取、酶切、酶连和转化均按文献 [11] 操作。枯草杆菌普通感受态细胞的制备参照文献 [13] 进行。

1.4 细胞壁蛋白基因(*cwp*)启动子和信号肽编码保守序列的扩增

参考文献 [14], 合成一对引物 P1 (5'-CCCAAGCTTCGTGAGAATGCGTACCAAA-3' 和 P2 (5'-TCCCCGGGCTGCAGCGAAAGCCATGGGAGCAAC-3'), 以短短小芽孢杆菌 B15 总 DNA 为模板, 扩增其 *cwp* 基因启动子和信号肽编码序列的保守区域, PCR 扩增体系 (25μL) 模板 DNA 50ng, dNTP (2.5mmol/L) 2μL, 引物 (1mmol/L) 各 1μL, 10 × Buffer 2.5μL, Mg²⁺ (2.0mmol/L) 1.5μL, *Taq* 酶 (5U/μL) 0.3μL, 超纯水 15.7μL。PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 40s, 60℃ 30s, 72℃ 50s, 30 个循环, 72℃ 5min。

1.5 PCR 产物的克隆和测序

PCR 扩增产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳纯化后, 用 DNA 胶回收试剂盒回收, 克隆至 T 载体后测序, 分析测序结果并提交至 GenBank 保存。

1.6 甲基对硫磷水解酶基因(*mpd*)穿梭分泌表达载体的构建和转化

重新设计引物 P3 (5'-CCTGGATCCATCTTCAACTTGGCTGTCGTA-3') 和 P4 (5'-CTCCTGCAGCGAAAGCCATGGGAGCAACAG-3') 扩增 *cwp* 基因启动子和信号肽编码序列, 在上游和下游引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点 (见下划线), PCR 扩增体系和反应条件同前所述。PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切, 用 V-gene DNA Extraction kit (50) 回收试剂盒 (捷倍恩生物技术有限公司) 回收后与同样酶切并回收的穿梭载体 pP43NMK 酶连, 酶连产物转化大肠杆菌 DH5α, 在含有 100μg/mL 氨基青霉素的 LB 平板上筛选转化子, 挑取转化子提取质粒并酶切

验证阳性克隆, 重组载体命名为 pP15MK, 含有 pP15MK 的大肠杆菌命名为 *E. coli* DH5α (pP15MK)。

1.7 枯草杆菌表达菌株的构建

提取表达载体 pP15MK, 转化枯草杆菌 1A751 感受态细胞, 在含有 20μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子, 转化子命名为 *B. subtilis* 1A751 (pP15MK)。

1.8 甲基对硫磷水解酶活性检测及活力测定

在加有甲基对硫磷 250μg/mL 的 LB 平板上用牙签点种大肠杆菌和枯草杆菌 pP15MK 的转化子, 置于 37℃ 温箱保温, 观察是否有黄色的水解圈出现。甲基对硫磷水解酶活力单位定义及酶活力测定方法见文献 [15]。

1.9 枯草杆菌 1A751(pP15MK) 的发酵试验

将 *B. subtilis* 1A751 (pP15MK) 接种于 3mL 添加 20μg/mL 卡那霉素的液体 Superrich 培养基中, 3℃ 过夜培养, 次日以 1.0% 的接种量接种于 200mL 同样的培养基中, 37℃、250r/min 摇床振荡培养。每 4h 取样一次, 测定发酵液在 600nm 处的吸光值, 同时测定发酵液的 MPH 酶活, 发酵液 12000r/min 离心 5min 后取上清检测上清中的 MPH 酶活。

2 结果和分析

2.1 启动子和信号肽编码序列的克隆及分析

具有高蛋白分泌能力的短短小芽孢杆菌分泌到胞外的蛋白质主要是细胞壁蛋白, 其细胞壁蛋白基因 *cwp* 由 5 个串联启动子控制, 这类启动子具有很强的起始转录功能, 细胞壁蛋白的信号肽序列具有一般革兰氏阳性菌信号肽序列的典型特征, 能有效介导细胞壁蛋白的分泌^[16], 故此类启动子和信号肽序列应该是驱动其它外源基因在革兰氏阳性菌中分泌表达的理想元件。我们合成了引物 P1 和 P2, 以短短小芽孢杆菌 B15 的总 DNA 为模板, 成功扩增到约 580bp 的特异性目的片段。将测序结果提交美国国立生物信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行在线 BLAST 分析发现, 我们克隆到的片段与 Udaka 等^[17] 克隆的短短小芽孢杆菌 47 和彭清忠等^[14] 克隆的短短小芽孢杆菌 50 的 *cwp* 基因启动子和信号肽编码序列的同源性分别为 99% 和 97%, 本序列及其精细结构分析结果已提交至 GenBank 登录, 登录序列号为: AY956423。

2.2 甲基对硫磷水解酶基因穿梭分泌表达载体的构建

重新设计并合成引物 P3 和 P4 扩增约 580bp 的

(0.03U/mL)^[8]。发酵液的酶活在培养到稳定期后期第48h时达到最高值为7.79U/mL,是出发菌株邻单胞菌M6表达量(0.96U/mL)^[8]的8.1倍。

3 讨论

枯草杆菌在工业上长期被用于生产蛋白酶、 α -淀粉酶等,其在相对简单的培养基中能生长到很高的密度,细胞的生长特性和生理学性质都被广泛、深入研究。经过几十年的努力,许多原核和真核基因在枯草杆菌表达系统中被克隆和表达,其中有的已应用于工业生产,取得了不少成绩^[18]。但是,用枯草杆菌作为产品生产菌也暴露出一些问题,例如枯草杆菌能够在稳定期表达大量蛋白酶从而造成目的蛋白的降解^[19]。本试验室曾经利用枯草杆菌强启动子P43和中性蛋白酶基因 $nprB$ 的信号肽编码序列与 mpd 基因阅读框融合,实现了 mpd 基因在敲除了8种蛋白酶基因的枯草杆菌WB800中高效分泌表达,但是由于该菌株仍然表达某些未知的微量蛋白酶的原因,在稳定期后期表达产物仍然约有26%被降解掉^[8]。因此研究和开发新的分泌表达载体-宿主系统,以实现目的基因稳定的高效分泌表达,有着重要的基础和应用研究意义。

短短小芽孢杆菌蛋白分泌能力强,胞外蛋白酶活性低^[5],利用其作为宿主菌有望建立一套优良的分泌表达系统。我们从植物根际土壤中分离到一株具有广谱抑制植物真菌性病害的短短小芽孢杆菌B15^[6],在脱脂牛奶平板上未检测到胞外蛋白酶活性,因此其有望作为分泌表达的优良宿主。从B15的总DNA中扩增得到了其 cup 基因的五联强启动子和信号肽编码序列,用其置换掉载体pP43NMK中 mpd 基因上游原有的P43启动子和 $nprB$ 基因的信号肽编码序列,成功构建了新的分泌表达载体pP15MK。我们首先将表达载体转入缺失了两个主要蛋白酶基因(胞外蛋白酶活性丧失97.4%)的枯草杆菌1A751中验证该载体功能,发现在短短小芽孢杆菌启动子带动和信号肽的引导下, mpd 在枯草杆菌中实现了高水平的分泌表达。Udaka等^[16]报道在短短小芽孢杆菌中,其细胞壁蛋白在对数生长期是紧密排列并结合在细胞壁上的,在稳定期细胞壁蛋白继续大量合成并脱落到培养基中。在本试验中,仅在枯草杆菌表达菌株发酵过程的稳定期后期检测到上清中有微弱的酶活,我们推测是由于枯草杆菌和短短小芽孢杆菌的细胞壁结构不同或者是因为枯草杆菌缺乏能够有效切割来自于短短小芽孢杆

菌信号肽的信号肽酶所致,从而导致分泌到胞外的MPH始终结合在细胞膜上而不能脱离信号肽而脱落到培养基中去。该表达菌株的表达产物一直保持稳定,有可能也是因为结合在细胞膜上受到了一定的保护作用从而不容易被培养基中游离的蛋白酶所降解。结果表明短短小芽孢杆菌 cup 基因的串联强启动子可以实现 mpd 基因在枯草杆菌中的高效表达,该启动子也应该是用来在枯草杆菌中表达其它目的基因的一个良好的启动元件。我们目前正在摸索和建立短短小芽孢杆菌B15的电转化和接合体系,本研究工作中分泌表达载体pP15MK的成功构建和初步应用为我们进一步建立短短小芽孢杆菌分泌表达系统奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Cui ZL, Li SP, Fu GP. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4922 - 4925.
- [2] Fu GP, Cui ZL, Huang TT, et al. Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase. *Protein Expres Purif*, 2004, **36**: 170 - 176.
- [3] Hung SC, Liao JC. Effects of ultraviolet light irradiation in biotreatment of organophosphates. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **56**: 37 - 47.
- [4] Doi RH, Wong SL, Kawamura F. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins. *Trends Biotechnol*, 1986, **4**: 232 - 235.
- [5] Chang S. Engineering for protein secretion in gram-positive bacteria. *Methods Enzymol*, 1987, **153**: 507 - 516.
- [6] Zhang XZ, Cui ZL, Hong Q, et al. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 4101 - 4103.
- [7] 张晓舟,徐剑宏,李顺鹏. 植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定. *土壤*, 2005, **37**(1): 85 - 88.
- [8] Wolf M, Geczi A, Simon O, et al. Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase, and xylanase. *Microbiology*, 1995, **141**: 281 - 290.
- [9] Takagi H, Kadowaki K, Udaka S. Screening and characterization of protein-hyperproducing bacteria without detectable exoprotease activity. *Agric Biol Chem*, 1989, **53**: 691 - 699.
- [10] Halling SM, Sanchez-Anzaldo FJ, Fukuda R, et al. Zinc is associated with the beta subunit of DNA dependent RNA polymerase of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1977, **16**: 2880 - 2884.
- [11] Joseph S, David WR. 分子克隆实验指南. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Doi RH. Isolation of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA. In: Rodriguez RL, Tait RC, eds. Recombinant DNA Techniques. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Co., Inc., 1983, 162 - 163.

- [13] Anagnostopoulus C , Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* , 1961 , **81** :741 – 746.
- [14] 彭清忠 , 张惟材 , 朱厚础. 短芽孢杆菌细胞壁蛋白基因多启动子和信号肽编码序列的分离. *生物技术通讯* , 2002 , **13** (1) 23 – 25.
- [15] Cui ZL , Zhang XZ , Zhang ZH , *et al.* Construction and application of a promoter-trapping vector with methyl parathion hydrolase gene *mpd* as the reporter. *Biotechnol Lett* , 2004 , **26** :1115 – 1118.
- [16] Udaka S , Yamagata H. Protein secretion in *Bacillus brevis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* , 1993 , **64** :137 – 143.
- [17] Adachi T , Yamagata H , Tsukagoshi N , *et al.* Multiple and tandemly arranged promoters of the cell wall protein operon in *Bacillus brevis* 47. *J Bacteriol* , 1989 , **171** :1010 – 1016.
- [18] Schallmeyer M , Singh A , Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species in industrial production. *Can J Microbiol* , 2004 , **50** :1 – 17.
- [19] Li WF , Zhou XX , Lu P. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* , 2004 , **155** :605 – 610.

Construction of the shuttle expression-secretion vector with the promoters and signal peptide-encoding sequence from *Brevibacillus brevis*

ZHANG Xiao-zhou , YAN Xin , CUI Zhong-li , LI Shun-peng*

(Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment , Ministry of Agriculture , College of Life Science ,
Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : The multiple and tandem promoters and signal peptide-encoding sequence of cell wall protein encoding gene was amplified from *Brevibacillus brevis* B15 total DNA , the PCR fragment was cloned , sequenced and analyzed , then was submitted to GenBank with a Accession No. AY956423. Another pair of primers were designed to amplify the fragment again , BamHI and PstI sites was introduced flanking the PCR production. BamHI/PstI digested fragment was cloned into the corresponding site of shuttle vector pP43NMK to generate the expression-secretion vector pP15MK. The inserted fragment was upstream of *mpd* gene and the signal peptide-encoding sequence was fused in frame with the *mpd* gene , which its own signal peptide-encoding sequence was deleted. The recombinant vector was transformed into *Bacillus subtilis* 1A751 , under the control of the promoters and signal peptide from *Brevibacillus brevis* B15 , *mpd* gene was continuously expressed and secreted at a high efficiency throughout the exponential growth phase and into the late stationary phase , the expression production methyl parathion hydrolase (MPH) was attached on the outside of the cell membrane. MPH activity accumulated to a maximum level of 7.79 U/mL after 48 h of cultivation at the late stationary phase , which was 8.1-fold higher than the expression level of the original *Plesiomonas* strain M6.

Keywords : *Brevibacillus brevis* ; Promoter ; Signal peptide ; Expression and secretion ; *Bacillus subtilis*

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30300005 ; 40471073) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2004246070 ; 2004214102) ; Chinese National Programs for Science and Technology Development (2005BA516A02-01 ; 2005BA516A02-02)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-25-84396314 ; E-mail : lsp@njau.edu.cn

Received : 14 October 2005 ; Accepted 21 November 2005 / Revised 22 December 2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>