

## 枯草芽孢杆菌渗透压调节基因 *proB* 的克隆和表达\*

张小青 曹军卫\* 翟超 陈建军

( 武汉大学生命科学院 武汉 430072 )

**摘 要** 用 PCR 扩增的方法从耐盐的枯草杆菌中克隆出一个 1.3kb 长的 DNA 片段,经功能检测,证明正向插入片段与大肠杆菌的脯氨酸营养缺陷特性(*proB*<sup>-</sup>)能够营养互补。含有该重组质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  在基本培养基上的耐盐能力从 2% 提高至 4%。通过引物步行法测定了该插入片段的核苷酸序列。利用 DNAsis 软件进行序列分析发现,该片段第 122 ~ 1235bp 核苷酸编码一个由 370 个氨基酸组成的蛋白质分子,其上游存在非典型的 -10 区,典型的 -35 区和核糖体结合位点,起始密码子处有最佳翻译起始效率的侧翼核苷酸序列。将其与 Genebank 中的已知基因的序列和编码的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明该片段与枯草杆菌 168 的核苷酸序列、氨基酸序列的同源性分别为 81% 和 90%。证明该基因确实是一个 *proB* 基因。通过与三十个不同种属微芽生物 *proB* 基因的氨基酸序列比较,发现该蛋白存在有可能与形成酶的活性中心和三维结构有密切关系的几个绝对保守的区域。

**关键词** 耐盐枯草芽孢杆菌, *proB* 基因, 克隆, 序列分析

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)02-0163-06

微生物在高渗环境的胁迫下,大多都可以合成或从环境中吸收一些低分子量物质来调节自身的渗透压以平衡外界渗透压的增高,这些低分子量物质,包括 K<sup>+</sup>、糖类(海藻糖、蔗糖)、醇类、氨基酸及其衍生物(脯氨酸、甜菜碱)<sup>1,2</sup>。微生物中累积这些低分子量物质主要是通过运输途径和合成途径。目前已发现枯草芽孢杆菌与脯氨酸运输有关的蛋白有 OpuE、ProV、ProW、ProX、ProZ 等<sup>3,4</sup>。而脯氨酸的合成在微生物中是由谷氨酸经过  $\gamma$ -谷氨酰胺激酶(GK)、 $\gamma$ -谷氨酰胺磷酸还原酶(GPR)和  $\Delta^1$ -二氢吡咯-5-羧酸还原酶(P5CR)三个酶催化而成,其中催化第一步的 GK 酶是脯氨酸合成代谢的限速酶。它是受终产物脯氨酸的反馈调节。因此 GK 酶活性的高低对脯氨酸的积累及与枯草芽孢杆菌耐渗透压能力的高低有关键影响<sup>5</sup>。本课题组对枯草芽孢杆菌不同菌株的耐盐能力进行了测定,发现它们的耐盐能力差别很大,其中枯草芽孢杆菌 93151 的耐盐能力最高。对其胞内相溶溶质的研究发现,该菌株在不含 NaCl 和含 1.4mol/L 的 NaCl 的基本培养基中生长时,其自由氨基酸库中脯氨酸含量从几乎测不到增至 33.3mg/g,表明脯氨酸是枯草芽孢杆菌 93151 的主要相容溶质物质<sup>6</sup>。本研究报道了枯草芽孢杆菌 93151 的 GK 酶基因 *proB* 的克隆,对其进行了核苷酸序列分析,并在大肠杆菌中进行了功能测定。希望研究该基因与细胞渗透压调节的关系,为阐明耐盐微生物的耐盐机理奠定了基础。

\* 通讯联系人

作者简介 张小青(1973-)男,在读硕士生,目前从事分子微生物学方面的研究。

收稿日期 2001-06-04, 修回日期 2001-09-26

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 93151,由中国典型菌种保藏中心(CCTCC)提供;大肠杆菌 1.1252[*p90c rec. araΔ(lacproB)recA*]购于中国微生物菌种保藏管理委员会的普通微生物中心(CGMCC);大肠杆菌(*E. coli*)DH5α[*supE44ΔlacU169(φ80lacZΔM15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]由本实验室保存。pMD-T载体,由pUC18载体改造而成。

**1.1.2 试剂和培养基:**pMD-T载体克隆试剂盒,PCR扩增试剂盒,均购于TaKaRa公司。低熔点琼脂糖购自Sigma公司,限制性内切酶及其他试剂均购自华美公司。LB培养基按照文献[7]的方法配制。BM培养基成分为(NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, 葡萄糖 10g, 用水定容至1000mL。EM培养基是在BM培养基中加入柠檬酸三钠 0.5g/L。

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体DNA的制备:**枯草芽孢杆菌93151基因组DNA制备参照林万明的方法,用酚、氯仿进行纯化<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 引物设计及PCR扩增:**登录Gen Bank查找相关的*proB*基因序列,主要参考枯草芽孢杆菌168的*proB*基因序列,运用PC/gene软件分别在*proB*基因上游和下游设计引物。上游引物5'-CACAAGCGCGTTCAATCAAGGTGG-3';下游引物5'-CAGTTCITTTGCG-GAGTCCGTTTGC-3'。PCR扩增参照TaKaRa的EX-Taq PCR试剂盒。实际的反应条件如下:①94℃ 5min;②4℃ 2min;③94℃, 1min;④54℃, 70s;⑤72℃, 2min;从第③步至第⑤步进行共30个循环;⑥94℃, 1min;⑦55℃, 2min;⑧72℃, 10min;⑨4℃, 10min。

**1.2.3 重组质粒的构建和阳性克隆的筛选:**用pMD-T载体克隆试剂盒进行扩增产物的克隆。扩增产物用1.0%低熔点琼脂糖凝胶电泳并回收,然后与pMD-T载体按5:1的摩尔量混和,加入连接酶,在16℃下连接反应30min后,转化大肠杆菌DH5α,并涂布在补充有X-gal, IPTG和Amp(100μg/mL)的LB平板。用蓝白斑法筛选阳性克隆。

**1.2.4 重组质粒的鉴定:**根据克隆载体上的多克隆酶切位点和扩增产物上预期的酶切位点的位置,选择合适的限制性内切酶,进行酶切后,用琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.5 插入片段的功能鉴定和受体菌的耐盐能力:**提取外源片段为正向插入的转化子pMDp-8的质粒,参照文献[7]方法将该质粒转入ProB<sup>-</sup>大肠杆菌1.1252中,涂布在含有Amp的EM平板上,37℃培养24h后,筛选转化子。将含有重组质粒的大肠杆菌DH5α和不含质粒的该菌分别同时接入不同盐浓度并加入维生素B1的基本培养基中,37℃培养48h。

**1.2.6 序列测定:**提取鉴定好的重组质粒,送武汉金贝公司进行序列测定。首先用M13正反向引物从插入片段的两端对测,然后用引物步行的方法将全序列测通。

## 2 结果和讨论

### 2.1 PCR扩增和重组质粒的构建

采用TakaRa的Ex-Tag PCR试剂盒,按照使用说明所述,进行PCR扩增。扩增产物进

行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,结果表明,在约 1.3kb 的位置有一条带(图 1),与设计引物之间的区域大小基本一致。为确保所扩增的产物有生物活性,选用了 TakaRa 的 Ex-TagPCR 试剂盒,它是在 LA-PCR 的原理上进一步改进而获得,具有 3' ~ 5' 的外切酶校正活性,所以有高保真、高效率的扩增特性。扩增产物根据“材料和方法”所述进行重组质粒的构建、转化和转化子的筛选。在补充有 X-gal、IPTG 和 Amp(100ug/mL)的 LB 平板上用蓝白斑法筛选阳性克隆。得到大量阳性克隆子。

## 2.2 重组质粒的鉴定

从大量的重组子中随机挑选 24 个白色菌落,提取质粒,进行琼脂糖凝胶电泳,结果发现约 90% 的转化子有外源片段插入。从其中挑选 4 个质粒用 *KpnI*、*SalI* 酶切鉴定插入片段的方向。因为 PCR 扩增产物在 3' 端多出一个 dA,而 T-载体在 3' 端加有一个 dT,当通过连接酶连接时,外源片段可能会以两种方向插入载体中。如果是正向插入,用 *kpnI* 单酶切时,得到一条约 4.0kb 的片段;用 *SalI* 和 *kpnI* 双酶切,可以得到两条带,大小分别为 2.7kb 和 1.3kb 左右。如果是反向插入,产生两个片段,大小约 2.7kb 和 1.3kb。

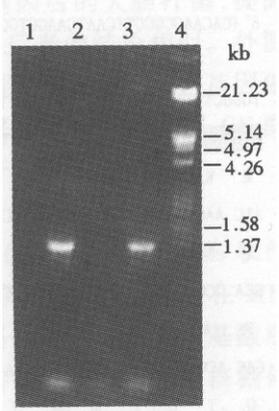


图 1 PCR 扩增产物

Fig.1 Amplification production of PCR

1.3. Amplification production of PCR; 2. control; 4.  $\lambda$ DNA/ *EcoRI*-*HindIII* marker.

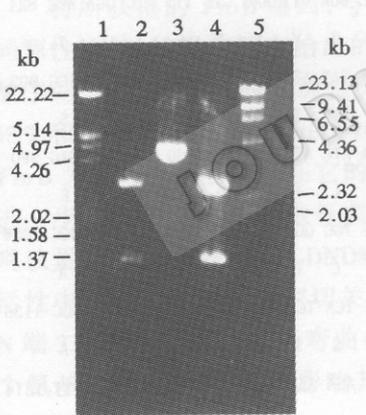


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 The analysis of enzyme 1.3. amplification production of PCR; 1.  $\lambda$ DNA/ *EcoRI* + *HindIII* Marker; 2. pMDP-2/ *kpnI*; 3. pMDP-8/ *kpnI*; 4. pMDP-8/ *SalI* + *kpnI*; 5.  $\lambda$ DNA/ *HindIII* Marker.

在所挑选的 4 个质粒中,有三个转化子用 *KpnI* 酶切为两条带可以鉴定为是反向插入(图 2,第 2 泳道,pMDP-2);一个为一条带,可以初步认为是正向插入(图 2,第 3 泳道,pMDP-8)再用 *KpnI*、*SalI* 双酶切后产生两条带,可确定它的外源插入片段为正向插入(图 2,第 4 泳道,pMDP-8)。

## 2.3 插入片段的功能鉴定和受体菌耐盐能力的测定

将鉴定为含有正向插入外源片段的重组质粒转化 *proB*<sup>-</sup> 的大肠杆菌 1.1252,获得大量转化子。这证明该插入片段含有的 *proB* 基因,能表达有活性的  $\gamma$ -谷氨酰胺酶,与大肠杆菌 1.1252 能够功能互补。

将不含质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和含有外源片段正向插入质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,分别接种在盐浓度为 1%、2%、3%、4%、5% 和 6% 并加入维生素 B1 的基本培养基中培养,发现不含重组质粒的 DH5 $\alpha$  在基本培养基中的最高的耐盐能力为 2%,而含有重组质粒(pMDP-8)的菌最高的耐盐能力为 4%。这说明外源 *proB* 基因的导入,确实

能够提高受体菌 DH5 $\alpha$  的耐盐能力。

Rudulier 等<sup>[9]</sup> 对大肠杆菌的研究发现,虽然大肠杆菌的突变株具有产生很高的 GK 酶活性的能力,并能够累积脯氨酸,但没有表现出耐渗透压能力的提高。而也有一些研

5' (CACAAAGCGCTTCAATCAAGTGG) TACCACGGAAAGCCACTTCGTCCTTATTTTCAGGACGGAA

-35                      -10                      RBS

TGGCCTTTTTTATTTGATCAGCCGGTTGGATTGATTGCCAAGGAGGAGAAACT

ATGAAA AAG CAG AGA ATT GTT GTG AAA ATC GGG AGC AGC TCG CTC ACA AAC AGT AAC GGA AGT ATT GAT GAA GCC AAA 200

M K K Q R I V V K I G S S S L T N S N G S I D E A K

ATC AAG GAG CAT ACG GAA GCC ATT TCA TTA TTA AAA GAA AAC GGG CAT GAA GTA ATC CTC ATT ACC TCA GGC GCG GTG 278

I K E H T E A I S L L K E N G H E V I L I T S G A V

GCA GCC GGT TIT TCC GCT CTC GGC TAT CCG GCG GCG CCC GTT ACG ATA AAA GGA AAG CAG GCA GCC GCC GCG GTC GCC 356

A A G F S A L G Y P A R P V T I K G K Q A A A A V G

CAG ACG CTT TTA ATG CAG CAA TAT ATG GAC CAT TTA AAA AGA TAC GGT CTG ACG CCG GCG CAA ATT TTA TTA ACA AGA 434

Q T L L M Q Q Y M D H L K R Y G L T P A Q I L L T R

AAT CAT TTC TCA AAA AGA GAG CGG TAC AGA AAT GCG TAT GCC ACG GTA ATG GAA TTA TTG GAG CGG GGA GTC GTG CCG 512

N D F S K R E R Y R N A Y A T V M E L L E R G V V P

ATT ATT AAT GAG AAT GAT TCC ACA TCA GTC GAA GAA CTG ACG TTC GGA GAT AAT GAC ATG CTG TCG CCG CTT GTG AGC 590

I I N E N D S T S V E E L T F G D N D M L S A L V S

GGC CTG ATT CAT GCA GAC CAA TTA ATG ATT CTC ACA GAC ATT AAC GGG CTG TAC GAT GCC AAT CCG AAT GAA AAC CCT 668

G L I H A D Q L M I L T D I N G L Y D A N P N E N P

GAC GCA AAG CGG TTT GAC TAT TTG ACT GAC ATT ACA CCT GAA TTG CTC GGG TAT GCC GGA TCA GCG GGC TCG AAG GTC 746

D A K R F D Y L T D I T P E L L G Y A G S A G S K V

GGC ACC GGA GGC ATG AAG TCA AAA CTT CTC GCT GCC CAG ACC GCA TTG TCG CTC GGA GTT AAG GTG TTT ATC GGA ACC 824

G T G G M K S K L L A A Q T A L S L G V K V F I G T

GGT GCC GGA CGG GAA AAA CTG AAG GTG ATT TTA GAC GGT AAA GGC GAC GGC ACA TAT ATC GGT GAT AAA GAG CTT TCC 902

G A G R E K L K V I L D G K G D G T Y I G D K E L S

TCC GTC AAT AAT ACA CGG CAA TGG ATC ATG TTT CAT TCT CCG ATA TCA GGG GAA ATC ATC ATT GAT GGG GGA GCG CAG 980

S V N N T R Q W I M F H S P I S G E I I I D G G A E

CAG GCG ATG ATC CAT AAC GGC TCA AGT CTC CTT CCG GCC GGT GTC GCC GAT GTC TGC GGC AGT TTT CCG AAA GGG GCC 1058

Q A M I H N G S S L L P A G V A D V C G S F P K G A

GTG GTG GAA GTC AGA GGT CCC GGC GGC ATC ATC GGC AAA GGG CAG ACG CAT TAC TCA TCC GAT GAG ATT TTG GAA GCC 1136

V V E V R G P G G I I G K G Q T H Y S S D E I L E A

AAA GGG AAG CGG AGC GAT CAG CTT CCG GGC GCG AAG CAG GTG GAA GTG ATT CAC AGA AAT GAT TGG GTG AAT TTA TTT 1214

K G K R S D Q L P G A K Q V E V I H R N D W V N L F

GAC GAG GGG GAA AAC AAA TGA 1235

D E G E N K \*\*\*

GTGAAGTATTGCAAAAAGCTCCCTTGGCAAAGAAGCCGCTGCCGAATGTCATGAAAACGACTGCTGAAAAAACGAAGCCCTCCAATGATT(GCAAAACGGACTCCG

CAAAGAAGCTG) 3' 1357

图 3 *proB* 基因的核苷酸序列和编码的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence and coding sequence of *proB*

ATC initiation codon; TGA stop codon; ATG AAA the best flanking sequence for translational initiation; TTGATG typical -

35 sequence; TTGATT non-typical -10 sequence; GGAGG ribosome-binding site; ATG next initiation codon.

究<sup>[10-13]</sup>证明,能累积脯氨酸的大肠杆菌突变株和转入外源 *proB* 基因后的大肠杆菌,提高了耐渗透压的能力。这两者的结果是完全相反。我们的结果与后者的结论相似。外源 *proB* 基因的导入使大肠杆菌耐盐能力提高的原因,可能是枯草芽孢杆菌的 *proB* 基因编码的 GK 酶对终产物脯氨酸的反馈抑制敏感性差,或可能是外源基因的导入增加了 GK 酶的表达量。*proB* 基因影响大肠杆菌耐盐能力的真实原因还有待于进一步研究。

## 2.4 序列测定及分析

通过引物步行法测定该插入片段的核苷酸序列,一共 1357bp(图 3)。用 DNAsis 软件进行序列分析发现,第 122 ~ 1235bp 核苷酸编码一个完整的开放阅读框架(ORF),在 M13 的反向引物下游有起始密码子 ATG,终止密码子为 TGA,其间编码一个由 370 个氨基酸组成的蛋白质分子。在起始密码子的上游 -7bp 处有一个富含嘌呤碱基的 GGAGG 核糖体的结合位点(RBS),一个非典型的 -10 区 TTGATT 和一个典型的 -35 区 TTGATG。这说明该片段具有完整的启动子结构和编码区。起始密码子 ATG 与核糖体结合位点处之间的距离为 7bp,在翻译起始的最佳范围 7bp ± 2bp 之内。另外,起始密码子处还有最佳翻译起始效率的侧翼核苷酸序列 ATGAAA,其转录产物的翻译效率是所有起始密码子侧翼核苷酸序列中最高的,能在翻译水平上提高酶的产量<sup>[14,15]</sup>。这种结构能使枯草芽孢杆菌受到外界高渗透压刺激时,在 *proB* 基因转录水平提高的基础上,同时翻译起始效率高,而使枯草芽孢杆菌为适应外界高渗环境而积累脯氨酸时更为有效。

## 2.5 同源性分析

将所获得的 *ProB* 基因,与 Gen Bank 中的已知基因的序列和编码的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明在给出的 237 个序列中,同源性最高的是 *Bacillus subtilis* 168,其核苷酸序列、氨基酸序列的同源性分别为 81% 和 90%。与耐盐芽孢杆菌的同源性则分别为 58% 和 72%。*Bacillus subtilis* 168 的 *ProB* 共有 354 个氨基酸。而枯草芽孢杆菌 93151 的 *ProB* 为 370 个氨基酸。在它的 C 端比 *Bacillus subtilis* 168 的 *ProB* 多出 16 个氨基酸。通过进一步与栖热菌属和芽孢杆菌属等 30 个不同属微生物 *proB* 基因的氨基酸序列比较,发现该蛋白存在 IINEND, GDNDM, GTGGM 等几个绝对保守的区域。它们可能与形成酶的活性中心和三维结构有密切关系。另外,在嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)中,GK 酶的 N 端 33 个氨基酸,在空肠弯曲杆菌空肠亚种和酿酒酵母等几个菌中,此酶 C 端约九十多个氨基酸可以缺失,而不影响其功能。推测多余的氨基酸很可能与微生物适应各自的生存环境有关。

## 参 考 文 献

- [1] Minmura H, Nagata S, Matsumoto T. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58**(10):1873 ~ 1874.
- [2] Sowers K R, Gumsalus R P. *Appl Environ Microb*, 1995, **61**(12):4382 ~ 4388.
- [3] Kempf B, Bremer E. *Arch Microbiol*, 1998, **170**(3):319 ~ 330.
- [4] Lin Y, Hansen J N. *J Bacteriol*, 1995, **177**(23):6874 ~ 6880.
- [5] 余叔文,汤章城.植物生理学和分子生物学.北京:科学出版社,1998:763.
- [6] 杨清香,曹军卫.武汉大学学报,1998, **44**(2):241 ~ 244.
- [7] Sambrook J, Fritsch F F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- [ 8 ] 林万明. 细菌分子遗传分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 52 ~ 54.
- [ 9 ] Rudulier D L, Strom A R, Dandekar A M, *et al.* *Science*, 1984 **224**( 5 ):1064 ~ 1068.
- [ 10 ] Moons A, Bauw G, Prinsen E, *et al.* *Plant physiol*, 1995, **107**( 1 ):177 ~ 186.
- [ 11 ] Csonka L N, Gelvin S B, Goadner B W, *et al.* *Gene*, 1988, **64**( 2 ):199 ~ 205.
- [ 12 ] Massarelli I, Forlani G, Ricca E, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **182**( 1 ):143 ~ 147.
- [ 13 ] Smith L T. *J Bacteriol*, 1985, **164**( 3 ):1088 ~ 1093.
- [ 14 ] 董克中. 基因及其表达. 北京: 科学出版社, 1996. 187 ~ 189.
- [ 15 ] Yamauchi K. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**( 10 ):2715.

## Cloning and Expression of a Osmoregulatory Gene *proB* from Halotolerant *Bacillus subtilis*

Zhang Xiaoqing Cao Junwei\* Zhai Chao Cheng Jianjun

( College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China )

**Abstract** : A 1.3kb fragment is cloned from halotolerated *Bacillus subtilis* 93151 with PCR amplification method, and its positively-directionally inserted fragment can complemented with *proB-E. coli* by function test. Halotolerated ability of *E. coli* DH5 $\alpha$  having this recombination plasmid rises from 2% to 4% in minimal medium. The nucleotide sequence of this fragment is obtained by primer walking method. Nucleotide sequence of this fragment 167 ~ 1269bp translates a protein which has 370 amino acid by sequence analysis through DNAsis program. There are non-typical-10 sequences, typical -35 sequences and a Ribosome binding site of this fragment in its upstream sequence, and there is flanking sequence, which has best efficiency of beginning translating. Homologues comparison. of nucleotide and amino acid sequences of this fragment and those of gene in gene bank shows that homogenous of Nucleotide sequences and amino acid sequences of this fragment and *Bacillus subtilis* 168 are respectively 81% 90%, which prove that this gene is certainly a *proB* gene. This protein translated by this fragment has several absolute conservative domain which have been correlating closely with forming active center of enzyme and tri-dimension structure of active center, compared amino acid sequences of this fragment and *proB* genes of thirty kinds of different microorganism

**Key words** : Halotolerant *Bacillus subtilis*, *proB* gene, Cloning, Sequencing

\* Author for correspondence