

利用 S-层蛋白在细胞表面展示 α -淀粉酶和金属硫蛋白

吴怀光 刘欣[△] 孙明* 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要 选用苏云金芽胞杆菌 CTC 菌株细胞表面 S-层蛋白作为表面展示载体,利用其 N-端信号肽以及锚定序列分别将不同生物特性的外源蛋白带到胞外并锚定在细胞的表面。为研究外源蛋白的分子量和生化特性对表面展示以及对其在细胞表面生物活性的影响,选用分子量较大的分泌性蛋白 α -淀粉酶和富含半胱氨酸的非分泌性蛋白金属硫蛋白作为目标蛋白。将 α -淀粉酶的结构基因(*amy*)和金属硫蛋白的结构基因(*smtA*)与 S-层蛋白的锚定区 *slh* 结合,构建融合蛋白基因 *slh/amy* 及 *slh/smtA*,克隆至穿梭载体 pHT304 上,得到重组质粒 pBMSA-304 和 pBMSM-304,转入带有帮助质粒的重组菌株 BMB171/pBMB-CSA 中,得到新的重组菌株 BMSAC 和 BMBSMC。SDS-PAGE 显示融合蛋白 SLH/AMY 和 SLH/SMTA 在重组菌的表面得到了表达。利用锥虫蓝染色/打孔加膜法表明重组菌 SAC 的确具有表面酶活性, α -淀粉酶被固定在细胞表面。碘液法测定的数据表明重组菌 SAC 的菌悬液样品较之受体菌 BMB171 菌悬液样品酶活提高了 42.4%。Ni-NTA-琼脂糖微球吸附试验显示重组菌 SMC 能够被微球所吸附,证实 SMTA 在重组菌表面具有活性。对游离镉离子的吸附试验显示重组菌对镉离子的吸附能力是对照受体菌的 4 倍。

关键词 苏云金芽胞杆菌, S-层蛋白, 细胞表面展示, 融合蛋白基因

中图分类号: Q812 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)05-0658-05

S-层蛋白是位于细胞外壳最外层的一类表面结构,生物圈中有 S 层的生物体普遍存在,这层结构对细菌细胞的生存及完整性有着很重要的作用^[1]。S 层是由蛋白质或糖蛋白亚基组成的单分子晶体点阵,它们形成有孔的网格结构覆盖在细胞表面^[2]。用 S-层蛋白进行细胞表面展示有很多优点。首先, S-层蛋白的表达量高,一般可达整个细胞蛋白的 10% ~ 15%^[2,3];其次, S-层蛋白具有高效的信号肽和表面定位结构,能够准确的定位在细胞表面,尽管如此,利用 S-层蛋白进行细胞表面展示对外源片段的大小仍有一定限制^[4]。Mesnage 等^[5]利用炭疽芽胞杆菌的 S-层蛋白在细胞表面展示了果聚糖蔗糖酶,但是到目前为止,还没有人利用苏云金芽胞杆菌的 S-层蛋白进行过蛋白质的表面展示工作。苏云金芽胞杆菌是土壤中广泛存在的一种细菌,已成功用于生物杀虫剂^[6]。我们克隆到了来自苏云金芽胞杆菌的 S-层蛋白基因 *ctc*^[7],该蛋白质 N-末端氨基酸序列与炭疽芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌的细胞表面 S-层蛋白具有 92% ~ 93% 的同源性^[7],其中细胞表面锚定所必需的 S 层蛋白同源模体(S-layer homology

motif, SLH) 同源性高达 97%,适合作为表面展示的载体^[8]。我们已利用这一 S-层蛋白在细胞表面展示了生化性质单一的多聚组氨酸肽^[9]。

α -淀粉酶(α -amylase)相对分子量为 50kD 左右,是一种分泌型的蛋白质,其活性易于检测,能任意切断淀粉分子内的 α -1,4-葡萄糖苷键,终产物为麦芽糖、糊精和少量葡萄糖^[10]。金属硫蛋白(Metallothionein, MT),分子量多位于 6 ~ 7kD,是一种非分泌型的蛋白质,富含半胱氨酸,占氨基酸总数的 16%,其间形成的二硫键对蛋白质折叠成正确的构象^[11]起稳定作用;有大量能结合重金属离子(如 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^{+})的巯基,广泛分布于生物体内^[12]。MT 能清除体内自由基,有效抵抗辐射,参与体内微量元素的储存、运输和代谢过程,能解除铅、汞、镉等重金属对生物体的毒害,还可用于医药业、化妆品业、保健食品业和环保行业^[12,13]。本研究选用上述两种蛋白质作为目标蛋白,研究了利用苏云金芽胞杆菌 S-层蛋白展示不同生物特性蛋白质的可行性,并探讨其在全细胞催化剂和全细胞吸附剂方面的应用潜力。

基金项目 国家自然科学基金(30080013),国家 973 项目(2003CB114201),国家 863 计划(2004AA214092)

* 通讯作者。Tel: 86-27-87283455; Fax: 86-27-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

作者简介 吴怀光(1979-)男,湖北黄冈人,硕士研究生,主要从事苏云金芽胞杆菌分子生物学研究。E-mail: elite@webmail.hzau.edu.cn

[△] 吴怀光和刘欣为同等贡献者。

收稿日期 2004-02-02, 修回日期 2004-04-26

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*) BMB171(库斯塔克亚种 YBT1463 cry-无质粒突变株, 见文献[14]), BMB171/pBMBCSA(辅助质粒 pBMBCSA 转入 BMB171, 见文献[9]), 质粒 pHT304(B.t 复制子, 氨苄青霉素抗性、红霉素抗性, 见文献[15]), 质粒 pBMB982-304(含有 *ctc* 基因的 DNA 片段插入 pHT304, 见文献[7]), 质粒 pB16(含有 α -amylase 基因的 DNA 片段插入 pUC13, 氨苄青霉素抗性, 见文献[10]), 质粒 pET-29a-smtA(含有 *smtA* 的 DNA 片段插入 pET-29a, 卡那霉素抗性, Dr. Robinson 惠赠, 见文献[11]), 质粒 pBMBCSA(含有 *csaAB* 操纵子的 DNA 片段插入 *E. coli*-G⁺ 穿梭载体, 含金黄色葡萄球菌复制起始点, 氨苄青霉素抗性, 四环素抗性, 见文献[9])。大肠杆菌在 37 $^{\circ}$ C 培养, 苏云金芽胞杆菌在 28 $^{\circ}$ C 培养, 均用 LB 培养基培养。抗生素使用浓度: 氨苄青霉素为 100 μ g/mL, 红霉素为 25 μ g/mL, 四环素 25 μ g/mL, 卡那霉素为 50 μ g/mL。

1.1.2 引物设计:根据 *amy* 基因的序列设计克隆该基因的引物 P1 和 P2, 并在结构基因前引入 *Xba* I 位点, 以与 *ctc* 基因上参与细胞表面锚定所必需的 *slh* 片段融合。根据 *smtA* 基因的序列设计引物 P3 和 P4, 并在结构基因前引入 *Xba* I 位点, 以与 *ctc* 基因的 *slh* 融合。

P1: 5'-CACATCTAGACGTCATCCTGCATGCGTTC-3' (含 *Xba* I 酶切位点); P2: 5'-GTAAAACGACGGCCACT-3'; P3: 5'-GAGATCTAGATATGACCTCAACA-3' (含 *Xba* I 酶切位点); P4: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGC-GG-3'

1.2 DNA 操作和蛋白质检测

质粒的提取、酶切、连接、转化、PCR 参照文献[16]的方法。细胞表面层蛋白样品制备: 挑取单菌落接种于 LB 培养基, 30 $^{\circ}$ C 摇床培养 12h, 收获菌体。取 1mL 菌液离心, 沉淀物用 1mol/L NaCl 和无菌水各洗涤 3 次后, 用 100~150 μ L 的无菌水悬浮, 并加入等量的 2 倍的上样缓冲液。混匀后, 在沸水中加热 3~5min, 冷却后离心取上清, 即得 SDS-PAGE 样品。SDS-PAGE 参照文献[16]的方法。蛋白定量采用上海四星生物技术公司生产的凝胶成像系统软件进行光密度测定后定量。

1.3 质粒电脉冲转化苏云金芽胞杆菌

按照文献[17]所述方法进行。

1.4 锥虫蓝染色法检测 α -淀粉酶活性

收集菌体培养制样, 菌体经 PBS(磷酸缓冲液, pH6.0)洗涤 3 次后重新悬浮于等体积 PBS(pH6.0), 检测基质 STA S 即 Starch, 可溶性淀粉 1.0%(W/V); T 即 Trypan blue, 锥虫蓝 0.01%(W/V); A 即 Agar 琼脂 1.5%(W/V) 灭菌后融化倾倒入平皿中, 经打孔、加滤膜处理后, 取起始培养物、菌悬液、上清液各样品适量滴加至孔中或滤膜上, 并以滤膜及 PBS 为对照。37 $^{\circ}$ C 反应 3h。

1.5 碘液法测定 α -淀粉酶活力

参照文献[18]的方法测定 α -淀粉酶活力。收集菌体培养物, 用 PBS 洗涤菌 2~3 次, 重新悬浮于 OD₆₀₀ 1.5 左右。取 1.0% 的可溶性淀粉 1mL 置于离心管中, 37 $^{\circ}$ C 保温 10min, 加入菌悬液、PBS 各样品 0.1mL 混匀。37 $^{\circ}$ C 保温 10min, 迅速取出离心, 吸上清 0.1mL 加入 1mL 0.1mol/L HCl 中, 混匀。从中取 0.3mL 加入 3mL 稀释 200 倍的 1.0% 碘液中, 混匀。用 UNICO7200 型分光光度计于 660nm, 以稀释碘液为参比测定 OD 值。一个淀粉酶单位定义为: 在规定条件下每分钟将浓度为 1.0% 的可溶性淀粉溶液的显蓝强度降低 1% 时所需的酶量。计算酶活力的公式为: U/mL = (B - X) / (B \times 10 \times V) \times 100, 式中 B 是对照吸光度值, X 为主值吸光度, V 是样品。

1.6 镉离子吸附试验

参照许朝晖等^[19]的方法。收集菌体培养物, 以 0.85%(W/V) NaCl 溶液洗涤菌体 3 次, 并重新悬浮。取 10 μ L 稀释成 1mL 以计数。样品加入等体积的 50 \times 10⁻⁶ g/mL CdCl₂ 溶液(0.85%(W/V) NaCl 溶液配制)。将混合物在 25 $^{\circ}$ C 摇床上缓慢振荡 24h。收集菌体, 以 0.85%(W/V) NaCl 溶液洗涤菌体两次后, 用 70%(W/V) 的硝酸过夜消化。稀释 100 倍后, 用全谱直读等离子体发射光谱仪对消化液中的 Cd²⁺ 进行定量测定, 波长为 228.8nm。计算每个细胞吸附 Cd²⁺ 个数的公式为: R = (X \times V) / (M \times N) / Y \times 稀释倍数系数。式中 X 是测定的 Cd²⁺ 浓度, Y 是测量的菌体数, V 是样品体积, M 是 Cd²⁺ 的分子量 112, N 是摩尔常数 6.02 \times 10²³, 稀释倍数系数综合了测定 Cd²⁺ 浓度和菌体数时的稀释倍数。

1.7 琼脂糖微球吸附实验

参照许朝晖等^[19]的方法。收集菌体培养物, 用 0.85%(W/V) NaCl 溶液洗涤菌体 3 次, 重新悬浮于 OD₆₀₀ 1.5 左右。同样用 0.85%(W/V) NaCl 洗涤 Ni-

NTA-琼脂糖微球 3 次,等体积悬浮。将菌悬液与 Ni-NTA-琼脂糖微球溶液以 9:1 (V/V) 的比例均匀混合,加入碘化丙啶,使其终浓度为 $4\mu\text{g}/\text{mL}$,然后用荧光显微镜 (OLYMPUS BX51) 对上述混合液进行观察。观察时使用 532nm 的绿色激发光。

2 结果

2.1 重组菌 BMBSAC 和 BMBSMC 的构建

以含有 *amy* (GenBank 登录号为 M32874) 的质粒 pB16 为模板,PCR 扩增引入了 *Xba* I 位点的 *amy* 结构基因,获得了符合预期大小 1.4kb 的特异性扩增产物。回收该基因片段,经 *Xba* I 和 *Eco* I 双酶切连接到载体 pHT304 上,得到质粒 pBMBSA-304。再由 *Xba* I 和 *Pvu* II 位点与经 *Xba* I 和 *Hin* II (不完全酶切) 消化的 pBMB982-304 的含 *slh* 和载体的部分相连,得到 pBMBSM-304。同样以克隆有蓝细菌金属硫蛋白基因 *smtA* (GenBank 登录号为 X64585) 的质粒 pET-29a-smtA 为模板,PCR 扩增引入了 *Xba* I 位点的 *smtA* 结构基因,获得符合预期大小 0.32kb 的特异性扩增产物。回收该产物,通过 *Xba* I 和 *Hinc* II 位点直接克隆到 pBMB982-304 上,得到含融合基因 *slh/smtA* 的重组质粒 pBMBSM-304。将 pBMBSA-304 和 pBMBSM-304 分别转入重组菌 BMB171/pBMBCSA,用红霉素和四环素双抗平板进行筛选得到重组菌 BMBSAC 和 BMBSMC。

2.2 融合蛋白 SLH/AMY 和 SLH/SMTA 在重组菌表面的表达

SDS-PAGE 结果显示(图版 II -A),重组菌 BMB-SAC 的菌体沉淀蛋白样品中可以检测到 SLH/AMY (预期大小为 83kD) 的融合蛋白,重组菌 BMBSMC 的菌体沉淀蛋白样品中可以检测到 SLH/SMTA (预期大小为 41kD) 融合蛋白,表明融合蛋白 SLH/AMY 及 SLH/SMTA 在重组菌 BMBSAC 及 BMBSMC 的细胞表面分别得到表达,证实了蛋白质的分子量以及分泌特性并未影响融合蛋白在细胞表面的表达。

2.3 重组菌 BMBSAC 的表面酶活

2.3.1 锥虫蓝染色法检测 α -淀粉酶活性 :为了检测 α -淀粉酶在重组菌 BMBSAC 表面上的活性,将受体菌 BMB171/pBMB-CSA 和重组菌 BMBSAC 分别接种于 BHI、BHI + Em/Tc 的液体培养基中,30℃ 摇床培养 12h。取等量菌体制备试验样品 :BMB171/pBMB-CSA 和 BMBSAC 的起始培养物 ;BMB171/pBMB-CSA 和 BMBSAC 的菌悬液 ;BMB171/pBMB-CSA 和 BMB-SAC 的上清液。用打孔加膜法直观检测样品的酶

活。以 STA 为检测基质,经打孔、加滤膜处理后,取以上样品适量滴加至孔中或滤膜上,并以滤膜及 PBS 为对照,37℃ 反应 3h。由于苏云金芽孢杆菌自身合成 α -淀粉酶并分泌到胞外,所以对起始培养物和上清的检测中重组菌和受体菌都会产生水解圈 [图版 II -B 中 3、5、8 显示的圈是由于加了滤膜引起的,去掉滤膜(图版 II -B 右图)后并未显示出水解圈] 但是重组菌 BMBSAC 的菌悬液样品的孔周围有一窄水解圈,而受体菌 BMB171/pBMB-CSA 的菌悬液样品的孔周围没有,而且垫有滤膜的样品处却都看不到水解圈,表明重组菌 BMBSAC 的确具有表面酶活 α -淀粉酶被固定在菌体表面,而未分泌至胞外,此结果表明利用 S-层蛋白可以将分子量较大的分泌性 α -淀粉酶锚定在细胞表面,并在表面实现其原有生物功能。

2.3.2 碘液法测定 α -淀粉酶活力 :通过碘液法定量测定了重组菌 BMBSAC α -淀粉酶表面酶活大小。以磷酸缓冲液 (PBS, pH6.0) 为对照,分别测定了重组菌 BMBSAC 和受体菌 BMB171/pBMB-CSA 菌悬液样品反应后的 OD_{660} (表 1)。可以看出,重组菌 BMB-SAC 的菌悬液样品较之受体菌 BMB171/BMB-CSA 菌悬液样品酶活平均提高了 42.4%。

表 1 碘液法检测重组菌 BMBSAC 表面 α -淀粉酶表面酶活
Table 1 α -amylase surface enzyme activity of recombinant strain BMBSAC

Sample enzyme activity(U/mL)	First	Second	Third
BMBSAC suspension	22.61	19.85	20.96
BMB171/pBMB-CSA suspension	15.74	14.03	14.75
Increased enzyme activity proportion/%	43.6	41.5	42.1

2.4 Ni-NTA-琼脂糖微球对 BMBSMC 的吸附

金属硫蛋白含有丰富的巯基,因而能螯合大量的金属离子。通过 MT 与 Ni^{2+} 间的螯合作用,表面展示金属硫蛋白的重组菌就可以被 Ni^{2+} 标记了的 Ni-NTA-琼脂糖微球颗粒所吸附。样品处理后经荧光染色镜检。受体菌 BMB171/pBMBCSA 中,只能看到零散的发光菌体,而无法看到琼脂糖微球,而重组菌 BMBSMC 的样品中,琼脂糖微球的轮廓依稀可辨,表明绝大部分菌体已被吸附于琼脂糖微球的表面(图版 II -C),此结果表明利用 S-层蛋白可以将分子量较小的非分泌性金属硫蛋白锚定在细胞表面,表面展示并未影响生化性质特殊的金属硫蛋白在细胞表面实现其原有生物功能。

2.5 BMBSMC 对游离镉离子的吸附

为了翔实表现重组菌 BMBSMC 对重金属离子

的吸附能力,又以游离的镉离子为底物进行了测试。表面展示金属硫蛋白的重组菌能吸附 6.58×10^7 个镉离子/每个细胞,而受体菌 BMB171/pBMB-CSA 仅能吸附 1.57×10^7 个镉离子/每个细胞,重组菌的吸附能力约为受体菌的 4 倍。

3 讨论

本研究结果表明利用苏云金芽胞杆菌 S-层蛋白可以在细胞表面展示不同生物特性的外源蛋白,外源蛋白的分子量大小及原有的分泌特性(或非分泌特性)并未影响融合蛋白的表达及表面展示,表达的融合蛋白可以在细胞表面实现其原有生物活性;对比利用 S-层蛋白可以在苏云金芽胞杆菌细胞表面展示结构简单的多肽的事实^[9],本实验结果表明生化性质特殊的富含半胱氨酸的金属硫蛋白也可以利用此系统被展示到细胞表面,并且在表面实现其生物学功能,这一点暗示该系统可用于展示生化性质特殊的外源蛋白。 α -淀粉酶的成功展示表明利用苏云金芽胞杆菌 S-层蛋白可用于展示其他目标蛋白,可以开发成全细胞催化剂。金属硫蛋白的成功展示有望开发成为全细胞吸附剂。具有吸附重金属离子功能的重组微生物细胞提供了一种用于净化工业废水、回收重金属及富集矿物质的有益的思路。首先吸附特性可以由微生物自身的繁殖传给下一代,通过发酵工程就可以得到大量具有吸附功能的微生物。其次,这种微生物细胞可以经固定制成填充柱的形式,而且采用 pH 梯度洗脱法还能将不同的离子(如 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 等)分步洗脱^[20]。这在实际操作上是可行的,并对金属离子的回收有了一定选择性。苏云金芽胞杆菌是一种分布范围广、对环境适应性强、对人畜基本无害的细菌,而且,由于苏云金杆菌制剂的杀虫功能,人们对其发酵生产的研究也相当成熟^[6]。表面展示金属硫蛋白的苏云金芽胞杆菌具有吸附重金属离子的良好性能,将其开发成为全细胞吸附剂在实际应用中将会有广阔的前景。

由于苏云金芽胞杆菌自身产 α -淀粉酶并分泌到胞外,所以在锥虫蓝染色法检测 α -淀粉酶活性中,阴性对照(BMB171/pBMB-CSA 菌悬液)因未能完全排除分泌过程中 α -淀粉酶的干扰也产生微弱的水解圈。为了排除这一干扰,可考虑获得 BMB171/pBMB-CSA 菌株 α -淀粉酶基因的中断菌株,以此为受体菌;也可考虑其它易检测的表面展示对象。另外从重组菌 SMC 的菌体沉淀 SDS-PAGE 结果中可以看出融合

蛋白 SLH/SMTA 的确在细胞表面表达了,但表达量并不高。这极有可能源于融合基因与宿主菌的匹配问题,尽管 S 层基因的启动子非常强^[2],受体菌无晶体突变株 BMB171 在表达 S-层蛋白及形成 S 层方面可能不太适合。*ctc* 基因的出发菌株 CTC 是最理想的选择。我室正开展构建出发菌株 CTC 的基因中断工作,有望开发成适合表面展示的宿主菌。

参 考 文 献

- [1] Sara M. Conserved anchoring mechanisms between crystalline cell surface S-layer protein and secondary cell wall polymers in Gram-positive bacteria? *Trends Microbiol*, 2001, **9**: 47-49.
- [2] Schuster B, Sleytr U B. S-layer-supported lipid membranes. *Review in Molecular Biotechnology*, 2000, **74**: 233-254.
- [3] Sleytr U B, Sara M. Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 20-26.
- [4] Stahl S, Uhlen M. Bacterial surface display: trends and progress. *Trends Biotechnol*, 1997, **15**: 185-192.
- [5] Mesnage S, Tosi-Couture E, Fouet A. Production and cell surface anchoring of functional fusion proteins between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levanucrase. *Mol Microbiol*, 1999b, **31**: 927-936.
- [6] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(3): 775-806.
- [7] 孙明,朱晨光,喻子牛. 类似 S-层蛋白的苏云金芽胞杆菌伴胞晶体蛋白基因的克隆. *微生物学报*, 2001, **41**(2): 141-147.
- [8] Sara M, Sleytr U B. S-layer proteins. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 859-868.
- [9] 王莉,孙明,喻子牛. 利用 S-层蛋白在苏云金芽胞杆菌表面展示多聚组氨酸肽. *实验生物学报*, 2003, **36**(6): 466-481.
- [10] Hu N T, Hung M N, Huang A M, et al. Molecular cloning, characterization and nucleotide sequence of the gene for secreted α -amylase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 1647-1655.
- [11] Shi J, Lindsay W P, Huckle J W, et al. Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*. Metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett*, 1992, **303**: 159-163.
- [12] Jacobs F A, Romeyer F M, Beauchemin M, et al. Human metallothionein-II is synthesized as a stable membrane-localized fusion protein in *Escherichia coli*. *Gene*, 1989, **83**: 95-103.
- [13] Sousa C, Kotrba P, Rumi T, et al. Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 2280-2284.
- [14] 李林,杨超,刘子铎,等. 苏云金芽胞杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及转化性能. *微生物学报*, 2000, **40**(1): 85-90.
- [15] Arants O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, **108**(1): 115-119.

- [16] Sambrook J , Fritsh E F , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [17] 吴 岚 , 孙 明 , 喻子牛 . 利用苏云金芽胞杆菌 Tn4430 转座子构建含有 *cry1Ac* 基因的解离载体 . 微生物学报 , 2000 , 40 (3) : 264 - 269 .
- [18] 杨国俊 , 黄日波 . BAE2 菌株淀粉酶某些特性的研究 . 广西农业大学学报 , 1996 , 15 : 142 - 145 .
- [19] Xu Z , Lee S Y. Display of polyhistidine peptides on the *Escherichia coli* cell surface by using outer membrane protein C as an anchoring motif . *Appl Environ Microbiol* , 1999 , 65 : 5142 - 5147 .
- [20] Chang J S , Huang J C. Selective adsorption/recovery of Pb , Cu and Cd with multiple fixed beds containing immobilized bacterial biomass . *Biotechnol Prog* , 1998 , 14 : 735 - 741 .

Cell Surface Display of α -amylase and Metallothionein by Using S-layer Protein of *Bacillus thuringiensis* Strain CTC

WU Huai-Guang[△] LIU Xin[△] SUN Ming* YU Zi-Niu

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

Abstract : A bacterial cell surface display system was developed by employing S-layer protein of strain CTC as a display carrier to display interesting proteins with different characteristics. α -amylase and Metallothionein were selected and fused with S-layer. The two proteins were translocated on the surface of host strain by means of the signal peptide and anchoring sequences (*slh*) which were essential to anchor interesting proteins on the cell surface , respectively. Recombinant plasmids pBMBSA-304 and pBMBSM-304 , one containing fusion gene *slh/amy* , and the other *slh/smtA* , were constructed and introduced into recombinant strain BMB171/pBMB-CSA , resulting in recombinant strain BMBSAC and BMBSMC. SDS-PAGE profiles demonstrated that the fusion protein SLH/AMY and SLH/SMTA were expressed on the surface of recombinant strain. The result of trypan blue drying indicated that α -amylase was anchored on the surface of cell and there was enzyme activity on the surface of recombinant strain. The detectable result of iodine method demonstrated that enzyme activity was increased 42.4% by comparing enzyme activity of intact cells of recombinant strain BMBSAC with that of strain BMB171. Moreover , Ni-NTA-agarose beads adhesion test showed that only recombinant strain BMBSMC could be attached to agarose beads. The result of the dissociate Cd²⁺ absorption demonstrated that absorption activity of recombinant strain was as four times as the control.

Key words : *Bacillus thuringiensis* , S-layer protein , Cell surface display , Fusion protein gene

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation(30080013) ; Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(2003CB114201) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2004AA214092)

* Corresponding author. Tel 86-27-87283455 ; Fax 86-27-87280670 ; E-mail : m98sun@mail.hzau.edu.cn

[△] Wu Huai-Guang and Liu Xin contributed equally to this work.

Received date 02-02-2004

本期广告索引

企业	版位	企业	版位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	南京宁和生化设备有限公司	文前彩插 II
安玛西亚(GE Healthcare Bio-sciences)	封二	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后黑白插 I
岛津(香港)有限公司	封三	镇江达森发酵设备有限公司	文后彩插 I
北京陆桥技术有限责任公司	文前彩插 I		