

双功能枯草杆菌诱导型高效表达分泌载体的构建与鉴定

李瑞芳^{1,2}, 张添元¹, 罗进贤^{1*}

(¹ 中山大学生命科学院 广州 510275)

(² 河南工业大学生物工程学院 郑州 450052)

摘 要 利用大肠杆菌质粒 pSP72 和枯草杆菌质粒 pUB18 共整合得到双功能克隆载体 pSB。在 pSB 多克隆位点依次引入枯草杆菌果聚糖蔗糖酶基因启动子-信号肽序列 *sacB p.s.*、地衣芽孢杆菌淀粉酶基因终止子序列 α -amy T 和短小芽孢杆菌增强子基因 *degQ*, 最终构建了双功能枯草杆菌诱导型高效表达分泌载体 pSBPTQ。将 Vasostatin I 基因作为靶基因检测 *sacB p.s.*、 α -amy T 和 *degQ* 在 pSBPTQ 进行外源基因表达时的功能, 结果表明, 在蔗糖诱导下, *sacB* 启动子有效启动了 Vasostatin I 基因的表达和分泌, α -amy T 提高了 Vasostatin I 基因的转录效率, 而 *degQ* 明显增强了 Vasostatin I 基因的表达水平。Vasostatin I 基因在蔗糖诱导下成功表达并分泌到枯草杆菌细胞外, 蛋白质分泌效率达到 90% 左右。质粒稳定性试验结果表明, 经过 40 个世代之后, 质粒 pSBPTQ 在枯草杆菌 DB1342 中仍旧保持在 83% 以上。

关键词 枯草杆菌; 双功能载体; 诱导型; 表达分泌; 构建

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0714-06

分泌表达作为蛋白质的一种表达形式具有以下几方面的优越性: ①产物一般可溶, 可正确折叠, 有生物活性; ②表达产物分泌至细胞外, 有利于分离纯化。枯草杆菌是一种非致病性微生物, 对人畜无害, 又具有完善的分泌系统, 能将外源基因产物分泌至胞外, 有利于外源产物的纯化和回收^[1,2]。但枯草杆菌质粒的提取与转化效率不及大肠杆菌, DNA 操作困难。在大肠杆菌中 DNA 分子操作简便易行, 但进行外源蛋白高效表达时易形成包涵体, 产物分泌表达水平低, 且常分泌至周质空间而非胞外。构建穿梭型大肠杆菌-枯草杆菌表达分泌载体, 将克服枯草杆菌 DNA 操作困难问题, 并能充分利用其分泌特性。因此, 有不少文献报道构建穿梭型大肠杆菌-芽孢杆菌分泌表达载体用于外源基因的表达^[3,4]。何翔等^[3]构建的芽孢杆菌穿梭载体 pHV-1 成功表达了 *cry1C* 基因, 彭清忠等^[4]构建的 pBKE50 成功分泌表达了 α -淀粉酶基因。

枯草杆菌多数细胞外蛋白酶在静止期表达和分泌, 而 *sacB* 编码的果聚糖-蔗糖酶是一种胞外酶, 在枯草杆菌对数生长期合成, 且这个酶的合成受蔗糖诱导和多个增强基因的正调控。本文利用枯草芽孢杆菌 *sacB* 启动子、信号肽序列、地衣芽孢杆菌终止子序列和短小芽孢杆菌增强子基因, 与芽孢杆菌质

粒 pUB18 和大肠杆菌质粒 pSP72 一起构建了一个诱导型高效表达分泌载体 pSBPTQ, 并以 Vasostatin-I 基因作为靶基因检测构建的 pSBPTQ 的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本试验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 酶和试剂 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶及其他修饰酶购自 GIBCO-BRL、NEB 公司及华美生物工程公司; DNA 快速胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 蛋白分子量标准购自 Promega 公司; 小鼠单克隆抗体由意大利 Corti A 博士惠赠; 山羊抗鼠 HRP-IgG 购自华美生物工程公司。

1.1.3 培养基 细菌培养用 LB 培养基^[8], 枯草杆菌工程菌发酵用 2 × MSR 培养基^[9]。

1.2 DNA 操作

大肠杆菌质粒小量制备、DNA 酶切连接和大肠杆菌转化按参考文献 [8] 介绍的方法进行。枯草杆菌质粒小量制备和枯草杆菌转化按参考文献 [10] 介绍的方法进行。酶切片段的分离回收采用上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收试剂盒, 按说明书介绍的方法进行。

基金项目 广东省自然科学基金资助(011207)

* 通讯作者。Tel: 86-20-84036205; Fax: 86-20-84036215; E-mail: jinxianluo@yahoo.com

作者简介 李瑞芳(1971-), 女, 河南南乐人, 博士, 研究方向为基因工程, 现在河南工业大学工作。E-mail: lrf@haut.edu.cn

收稿日期 2005-12-08; 接受日期 2006-02-13; 修回日期 2006-05-08

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids		
Strains and plasmids	Gene type	Origins
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17(φ80lacZΔM15) RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Store in this laboratory
<i>B. subtilis</i> DB1342	<i>his nprR2 nprE18 aprAS epr</i>	This laboratory
Plasmids		
pSP72	<i>Amp^r</i>	Promega
pUB18	<i>Km^r</i>	Dr. Doi, UC Davis, USA
pPBQ7	<i>Cm^r degQ</i>	This laboratory ^[5]
pCRII p. s.	<i>Amp^r, sacB p. s.</i>	This laboratory ^[6]
pUSGH	<i>Kan^r</i>	This laboratory ^[7]
pChCGA	<i>Amp^r, Chromogranin A cDNA</i>	Dr. Helman, USA

1.3 引物合成和 PCR 扩增

按 Chromogranin A cDNA 序列合成引物。为方便连接,在上游引物 5'端添加 *Pst* I 酶切位点、下游引物 5'端添加 *Kpn* I 酶切位点。为保证正确的读码框,在 *Pst* I 位点后添加两个核苷酸。为使翻译在设定位置停止,在下游引物中添加终止密码子 TAA。以 CGA cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增条件为: 94℃ 5min; 94℃ 1min, 58℃ 30s, 72℃ 1min; 共进行 30 个循环,最后 72℃ 10min。扩增完毕,取 10μL 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.4 重组质粒的鉴定

菌落直接 PCR 按照文献 [11] 介绍的方法进行。经菌落直接 PCR 筛选到的阳性菌落进行培养,提取质粒 DNA,用相应的限制性内切酶进行酶切鉴定,能够切出目的片段的质粒为重组质粒。

1.5 枯草杆菌工程菌的表达

将含重组子的单菌落接种于含卡那霉素 (10μg/mL) 的 LB 培养基中,37℃ 250r/min 振荡培养过夜。按 5% 接种量接种含卡那霉素 (10μg/mL) 的 2 × MSR 培养基中,37℃、250r/min 振荡培养 2h 后加蔗糖至终浓度为 2%,继续振荡培养 30h,4℃、10000r/min 离心 10min,分离菌体和培养上清。菌体经细胞破碎仪破碎,制备粗制包涵体。取培养上清、菌体和粗制包涵体进行电泳。

1.6 分离小分子肽的 SDS-PAGE 和免疫印迹

SDS-PAGE 根据文献 [12] 介绍的方法进行。免疫印迹技术按文献 [8] 介绍的方法进行。

1.7 质粒稳定性实验

参照陈启民^[13]的方法进行。

2 结果和分析

2.1 双功能枯草杆菌诱导型高效表达分泌载体的构建及酶切分析

构建 pSBPTQ 质粒技术路线参见图 1。将 pSP72 用 *pvu* II 和 *Hind* III 酶切,产生一个平末端和一个粘

性末端。pUB18 用 *Eco* R I 酶切,用 Klenow 片段补平末端,再用 *Hind* III 酶切,也产生一个平末端和一个粘性末端。经连接酶连接,整合后的质粒 pSB 保留了 pSP72 的多克隆位点。通过连接处 DNA 序列分析,pUB18 经 *Eco* R I 酶切并补平后与 pSP72/*pvu* II 位点连接,会重新生成一个 *Eco* R I 位点。所以 pSB 用 *Eco* R I 酶切,可切出线性 pSP72 (2.4kb) 和 pUB18 (3.6kb) 的 DNA 片段。

为了构建诱导型表达载体,从本实验室构建的载体 pCRII-P.S. 切出约 600bp 的枯草杆菌果聚糖蔗糖酶基因的启动子-信号肽序列 (*sacB p. s.*),通过一端平端和一端粘端连接在 pSB 多克隆位点一端,得到质粒 pSBP。pSBP 上有两个 *Nde* I 位点,分别来自 pSP72 和 pUB18。一个 *Nde* I 位点在 *sacB p. s.* 序列上游约 100bp 处,另一个在 *sacB p. s.* 序列下游 2.4kb 处。用 *Nde* I 酶切 pSBP 后,再用 *Pst* I 酶切,就会将 *sacB p. s.* DNA 片段切下来。pSBP/*Nde* I + *Pst* I 的酶切产物比 pSB/*Nde* I + *Pst* I 的酶切产物多出一条 DNA 带,约 700bp,即为由约 600bp 的 *sacB p. s.* 和约 100bp 的 *Nde* I 到 *sacB p. s.* 近末端之间的 DNA 片段组成。

为了能在诱导表达时,使转录有效终止,提高转录效率,从本实验室构建的 pUSGH 载体上切下 428bp 的地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的终止子序列 α-amy T, 连接在 pSBP 的 *Sac* I 位点。通过连接处 DNA 序列分析,有一种连接方式会产生一个新的 *Bam* H I 位点。当用 *Bam* H I 酶切转化子质粒时,得到一个这种连接方式的重组子,就选这个重组子命名为 pSBPT,进行下一步操作。

为提高外源基因表达水平,从 pPBQ7 上切下短小芽孢杆菌增强子基因 *degQ* 表达元件,连接在 α-amy T 下游的多克隆位点,得到质粒 pSBPTQ。*degQ* 表达元件由 *LacZ* 启动子和 *degQ* 基因组成,在 *LacZ* 启动子和 *degQ* 结构基因接口处有 *Hind* III、*Pst* I、*Sal* I 限制性内切酶位点。由于 *deo* O 通过补平末

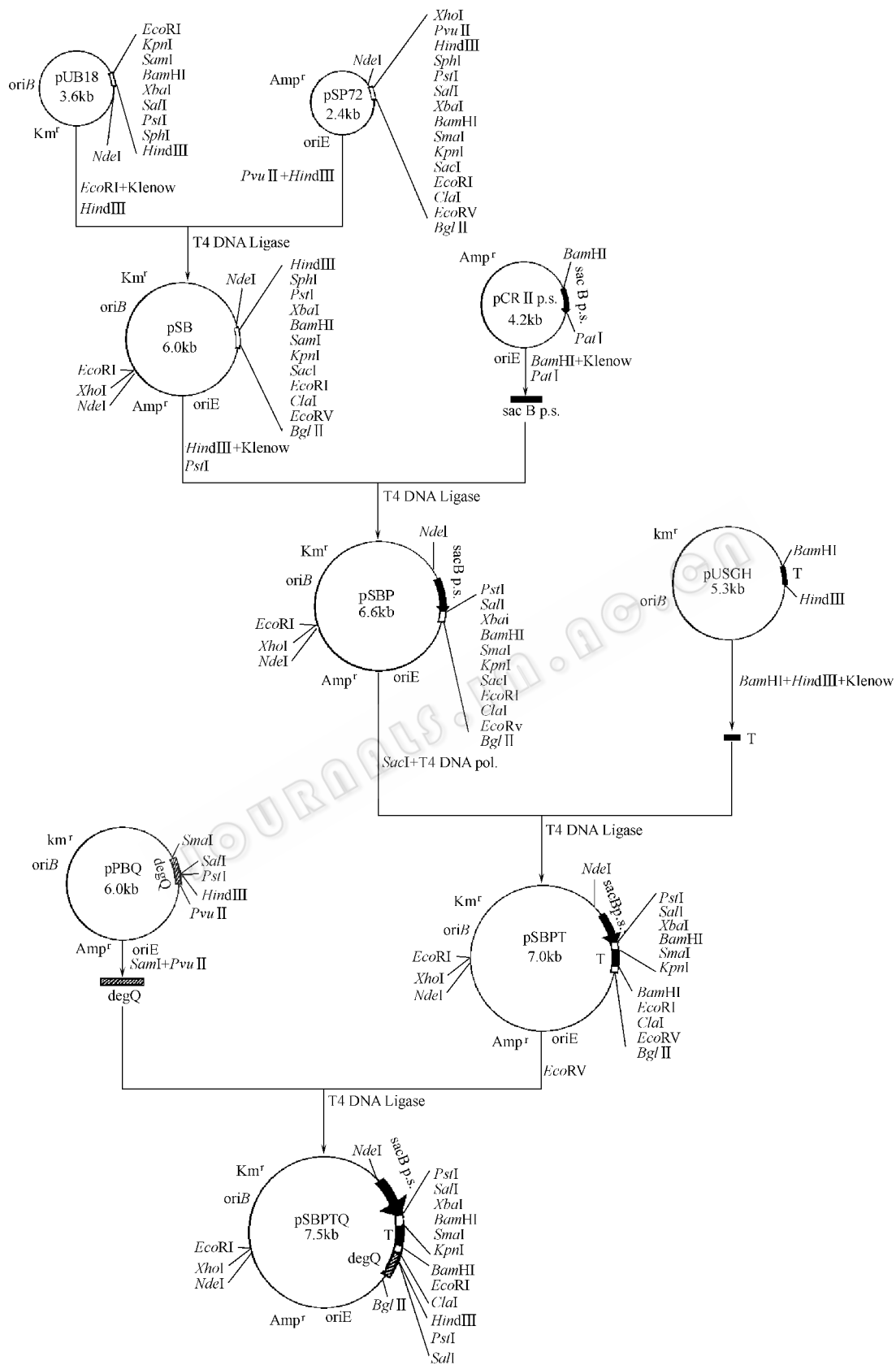


图 1 双功能枯草杆菌诱导型高效表达分泌载体 pSBPTQ 的构建

Fig.1 Construction of inducible and efficient expression-secretion shuttle vector pSBPTQ of *B. subtilis*.

端,再连接到载体上,因此,会出现两种连接方式。如果同向连接,连接后经 *Pst* I 酶切,会得到 700bp DNA 片段,分别是 428bp 的淀粉酶基因终止子 DNA 和大于 250bp 而小于 300bp 的 *LacZ* 启动子组成。如果反向连接,连接后经 *Pst* I 酶切,会得到 566bp 的 DNA 片段,是由 428bp 的淀粉酶基因终止子序列和 138bp 的 *degQ* 基因组成。由酶切产物琼脂糖凝胶电泳分析结果可知得到的重组子 pSBPTQ 上 *LacZ* 启动子与 *sacB* 启动子同向(图略)。

分别将各步获得的连接产物转化大肠杆菌,得到转化子。转化子扩大培养后,提取质粒进行酶切,鉴定阳性重组质粒。重组质粒经过克隆、提取、纯化,进行下一步重组质粒的构建。最后得到重组质粒 pSBPTQ,提取 pSBPTQ 质粒转化表达宿主枯草杆菌,转化子具有卡那霉素抗性。

2.2 引物合成和 PCR 扩增结果

按 1.3 的方法设计并合成引物,引物序列如下:引物 1:5'-AACTGCAGAACTCCCTGTGAACAGCCCT-3'(*Pst* I);引物 2:5'-GGGGTACCTTACTGCTGATGTGCCCTCTG-3'(*Kpn* I)。用引物 1 和引物 2 以 Chromogranin A cDNA 为模板 PCR 扩增 Vasostatin I 基因,扩增出一条约 249bp 的 DNA 片段。

2.3 含 Vasostatin I 基因重组质粒的构建及酶切分析

含 Vasostatin I 基因的重组质粒的构建如图 2-A。将 pSBP、pSBPT 用 *Pst* I、*Kpn* I 进行酶切,与经 *Pst* I、*Kpn* I 酶切的 PCR 产物连接,构建含 Vasostatin I 基因的重组质粒 pSV 和 pSVT。pSBPTQ 上有两个 *Pst* I 位点,在 *Pst* I、*Kpn* I 中间插入外源片段时,首先需要将 pSBPTQ 用 *Pst* I 进行部分酶切,电泳回收 7.5kb 大片段,再用 *Kpn* I 酶切,电泳回收 7.5kb 大片段;与经 *Pst* I、*Kpn* I 酶切的 PCR 产物连接,构建含 Vasostatin I 基因的重组质粒

pSVTQ。连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,菌落直接 PCR 挑选阳性克隆。将阳性克隆经过培养后,提取质粒,用 *Pst* I、*Kpn* I 进行酶切(图 2-B)。pSV、pSVT 经 *Pst* I、*Kpn* I 酶切后,切出一条带与 Vasostatin I PCR 产物大小相同。pSBPTQ 用 *Pst* I、*Kpn* I 酶切后,切出两条带,pSVTQ 用 *Pst* I、*Kpn* I 酶切后切出 3 条带,多出的条带与 Vasostatin I PCR 产物大小相同。结果表明 Vasostatin I 基因已经克隆到 pSB、pSBP 和 pSBPTQ 中。

2.4 Vasostatin I 基因的表达

将构建好的 pSV、pSVT 和 pSVTQ 转化枯草杆菌菌株 DB1342,挑一个转化子按 1.5 介绍的方法进行表达。收集培养液上清进行 SDS-PAGE 和免疫印迹分析。重组 Vasostatin I 理论分子量为 8.7kDa,由图 3 可知泳道 4、5 与对照相比,在 8.7kDa 处多出一条蛋白带,而泳道 3 看不到目的蛋白条带。用小鼠单克隆抗体进行免疫印迹分析,在泳道 4、5 出现阳性杂交带,但泳道 4 的杂交信号明显弱于泳道 5,而另 3 个泳道没有出现阳性杂交带。结果表明仅有 *sacB p.s.* 不能有效表达目的蛋白,添加终止子序列之后,目的蛋白得到有效表达,而增加了增强子 *degQ* 元件后,目的蛋白的表达量明显提高。因而,*sacB p.s.*、 α -amy *T*、*degQ* 元件对 pSBPTQ 用于外源基因的分泌表达均具有重要作用,且 *degQ* 对 *sacB* 启动子具有明显的正调控作用。

DB1342(pSVTQ)的菌体、培养上清和粗制包涵体电泳结果(图 4)显示约 90% 的重组 Vasostatin I 被分泌出来,泳道 3 没有目的蛋白质说明 Vasostatin I 在 *sacB* 信号肽引导下,以活性形式被表达分泌出来。

2.5 pSBPTQ 的稳定性

pSBPTQ 在 *E. coli* DH5 α 和 *B. subtilis* DB1342 中的稳定性实验结果如图 5 所示。结果表明,

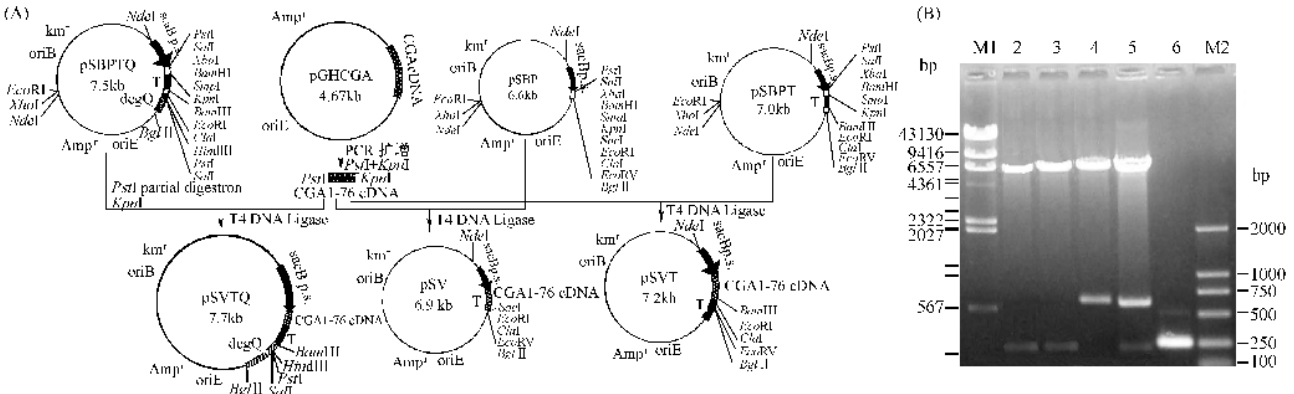


图 2 重组质粒 pSV、pSVT 和 pSVTQ 的构建 (A) 及酶切琼脂糖凝胶电泳分析 (B)

Fig. 2 Construction (A) and gel electrophoresis analysis (B) of the restriction product of pSV, pSVT and pSVTQ. *Kpn* I; 6. PCR Product; M2. DNA Ladder.

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

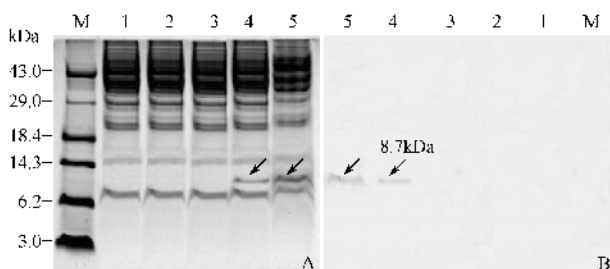


图3 枯草杆菌工程菌表达产物 SDS-PAGE (A) 和免疫印迹分析 (B)

Fig.3 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) of expressed products from *B. subtilis* engineered strains. M. Low range protein marker; 1. DB1342 (pSBPTQ) induced; 2. DB1342 (pSVTQ) non-induced; 3. DB1342 (pSV) induced; 4. DB1342 (pSVT) induced; 5. DB1342 (pSVTQ) induced.

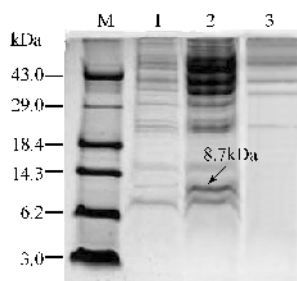


图4 DB1342 (pSVTQ) 菌体、培养上清及包涵体 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of DB1342 (pSVTQ) cells, supernatant and inclusion body. M. Low range protein marker; 1. *B. subtilis* DB1342 (pSVTQ) cells; 2. DB1342 (pSVTQ) supernatant; 3. Inclusion body.

pSBPTQ 在大肠杆菌中比较稳定, 100 个世代后, 质粒保持在 85% 以上。在枯草杆菌中的稳定性较差, 40 个世代后, 质粒保持率为 83%, 100 世代后, 质粒保持率降到 20%。

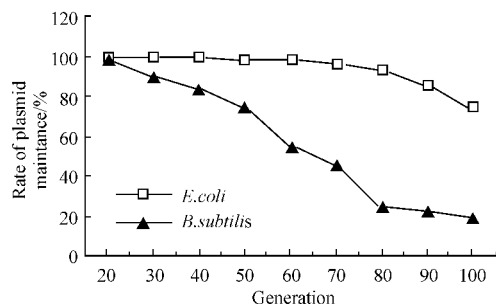


图5 质粒 pSBPTQ 在 *E. coli* DH5α 和 *B. subtilis* DB1342 中的稳定性

Fig.5 Stability of pSBPTQ in *E. coli* DH5α and *B. subtilis* DB1342.

3 讨论

由于枯草杆菌多数细胞外蛋白酶在静止期表达和分泌, 为避免外源蛋白被蛋白酶分解, 应使外源蛋白在枯草杆菌的对数生长期表达和分泌。sacB 编码的果聚糖-蔗糖酶是一种胞外酶, 在枯草杆菌的对

数生长期合成, 且这个酶的合成受蔗糖诱导, 故选用 *sacB p. s.* 作为表达外源基因的启动子和信号肽。将 *sacB p. s.* 克隆在 pSB 的多克隆位点。构建一个表达载体, 还需要有一个具有转录终止能力的终止子。本文选用芽孢杆菌 α-淀粉酶基因的终止子。枯草杆菌基因组中至少有 10 个位点参与了蔗糖代谢过程的遗传控制, *degS-degU* (旧称 *sacU*)、*degQ* (旧称 *sacQ*)、*sacX-sacY* (旧称 *sacS*)、*degR* (旧称 *priR*) 等芽孢杆菌的正调控基因能增强包括果聚糖-蔗糖酶在内的多种水解酶类基因的表达^[14]。因此, 我们将本实验室克隆的 *degQ* 基因克隆到 pSB 上, 构建了枯草杆菌双功能诱导型高效表达-分泌载体 pSBPTQ。该载体既可以应用比较成熟的大肠杆菌质粒提取方法提取, 又可通过转化转入枯草杆菌进行表达研究。与文献 [3, 4] 报道的穿梭型表达分泌载体相比, 本研究构建的 pSBPTQ 还具有以下几方面的优点: ①它是一个诱导型表达分泌载体, 为实现外源基因的高密度发酵奠定了基础; ②pSBPTQ 上有增强基因 *degQ* 正调控 *sacB* 启动子, 提高了 *sacB* 的转录效率; ③pSBPTQ 上的 *sacB p. s.* 和 *degQ* 基因两侧保留有常见限制性内切酶位点, 便于进一步进行亚克隆操作。

用 Vasostatin I 基因作为靶基因检测质粒上各组成元件的作用, 发现在蔗糖诱导下 *sacB p. s.* 有效启动了 Vasostatin I 基因的表达, 终止子序列 α-amy T 对外源基因转录的有效终止提高了转录效率, 从而提高了外源基因的表达水平, *degQ* 对 *sacB* 启动子具有明显的正调控作用, 对提高 pSBPTQ 外源基因的表达水平具有重要作用。实验结果证明本文所克隆的这些遗传元件均为 pSBPTQ 表达外源基因的有效元件。何翔等^[3]构建的穿梭载体 pHV-1 在芽孢杆菌中能稳定 40 个世代左右, 本文构建的 pSBPTQ 在枯草杆菌中的稳定性与之差别不大, 也是在 40 个世代左右。

本实验采用菌落直接 PCR 方法筛选重组子具有快速、方便的特点。Sathe 等^[11]的实验表明将含有质粒的大肠杆菌经过 94℃ 变性 1min 以后, 用倒置显微镜观察发现大部分细胞破裂, 释放出 DNA, 为菌落直接 PCR 提供了依据。可利用 PCR 的 94℃ 变性反应使细菌 DNA 释放出来做模板, 菌落直接 PCR 检测重组质粒, 为某些情况下无法通过酶切区分载体 DNA 和重组子 DNA 提供了检测手段。不过, 由于枯草杆菌细胞壁厚, 进行枯草杆菌工程菌菌落直接 PCR 时, 需先挑少许枯草杆菌菌体混悬于 20 μL ddH₂O 沸水浴 10min, 离心取 5 μL 水相作模板进行 PCR 扩增。

参 考 文 献

- [1] Wong SL. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current Biology*, 1995, **6**: 517–522.
- [2] Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 1999, **72**: 185–195.
- [3] 何翔,刘坤,李冬颖,等. *B. thuringiensis* 穿梭载体的构建及 *cry1C* 基因的表达. 遗传学报, 2000, **27**(7): 647–653.
- [4] 彭清忠,张惟才,朱厚础. 短短小芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭分泌表达载体的构建. 生物工程学报, 2002, **18**(4): 438–441.
- [5] 罗进贤,王凌,张添元,等. 短小芽孢杆菌 *degQ* 基因的克隆与鉴定. 生物化学杂志, 1997, **13**(2): 125–129.
- [6] 王红革,李文清,徐柏年,等. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的诱导表达. 微生物学报, 1997, **37**(2): 101–106.
- [7] 李文清,王红革,罗进贤,等. 猪生长激素 cDNA 在芽孢杆菌中的表达. 生物化学杂志, 1993, **9**(4): 434–440.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- [9] Park YS, Kai K, Lijima S, et al. Enhanced β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, **40**: 686–696.
- [10] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of *B. subtilis* by deoxyribonucleate. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1958, **44**: 1072–1078.
- [11] Sathe GM, Obrien S, McLaughlin MM, et al. Use of polymerase chain reaction for rapid detection of gene insertions in whole yeast cells. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4775.
- [12] 吴冠芸,潘华珍,吴翠. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社, 1999.
- [13] 陈启民,耿运琪,倪津,等. 短小芽孢杆菌作为芽孢杆菌属基因工程受体菌的研究. 遗传学报, 1989, **16**(2): 206–212.
- [14] Klier A, Masdek T, Rapoport G. Positive regulation in the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1992, **6**: 429–459.

Construction of an inducible and efficient expression-secretion shuttle vector of *B. subtilis*

LI Rui-fang^{1,2}, ZHANG Tian-yuan¹, LUO Jin-xian^{1*}

(¹ School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

(² School of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract A new shuttle vector pSB which could replicate in both *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* was constructed by fusing the *E. coli* plasmid pSP72 with the *B. subtilis* plasmid pUB18. After the *sacB* promoter and signal peptide sequence of *B. subtilis* was inserted in the multiple cloning sites (MCS) of pSB, The recombinant plasmid was designated as pSBP. The α -amylase gene terminator of *Bacillus licheniformis* was inserted at the other end of the MCS, resulting in expression-secretion plasmid pSBPT. After a positive control gene *degQ* of *Bacillus pumilus* was then cloned into pSBPT, and the inducible and efficient expression-secretion shuttle vector pSBPTQ was thus constructed. To identify the function and the necessary of *sacB p.s.*, α -amylase terminator, and *degQ* in the expression of heterologous gene of pSBPT, the DNA fragment encoding for vasostatin I was cloned downstream of *sacB p.s.* of pSBP, pSBPT and pSBPTQ, and the resultant plasmid pSV, pSVT and pSVTQ were then transformed into *B. subtilis* strain DB1342. The transformants were screened on LB plates containing 10 μ g/mL kanamycin. The positive transformants were separately grown on kanamycin containing 2 \times MSR medium and sucrose was added to 2% final concentration for induction after 2h cultivation. The culture supernatant was used to run SDS-PAGE and Western blot. The results show that after induced by sucrose, very few recombinant Vasostatin I was expressed in DB1342 (pSV), and recombinant Vasostatin I expressed in DB1342 (pSVTQ) with the positive control gene *degQ* is more than in DB1342 (pSVT) without *degQ*, suggesting that the Vasostatin I gene expression in pSVTQ was enhanced by *degQ*. Comparing the recombinant Vasostatin I in DB1342 (pSVTQ) cells and its culture supernatant, the SDS-PAGE result show that most of the recombinant Vasostatin I was secreted into the culture supernatant and there is no Vasostatin in inclusion body, the secretion rate is about 90%. The result of plasmid stability test show that pSBPTQ maintains at 83% in *B. subtilis* after 40 generations.

Keywords : *B. subtilis* ; Shuttle vector ; Induced ; Expression-secretion ; Construction