

嗜碱性芽孢杆菌启动子的克隆及 某些因子对表达的影响

陈永青 宋大新 许钢锋*

(复旦大学生物系, 上海)

从土壤中分离到一株嗜碱性芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. No. 2), 并初步分析了该菌的基本特性。以抗性基因启动子缺失质粒 pGA46 为载体, 从该菌的染色体 DNA 中, 克隆了带有启动子的一些片段, 并引入大肠杆菌得到表达。其中某些启动子的表达受到某些环境因子(如 pH, NaCl) 的调控。

关键词 嗜碱性芽孢杆菌; 启动子; 表达

目前, 极端环境 (extreme environment) 下的微生物越来越引起人们的重视, 新的菌种不断发现, 对它的遗传特性分析不仅有助于微生物生态和进化的研究, 同时也是开发有经济价值工业用酶的一条重要途径。

嗜碱性微生物 (alkalophilic microorganism) 是一类在较碱环境中 (pH 9—11) 有最适生长的微生物的总称。自从 Korikoshi 等^[1]从土壤中分离出大量嗜碱性微生物以后才真正开始了对它的系统研究。不但研究了嗜碱性芽孢杆菌产生并分泌的一类特异酶即碱性酶, 包括蛋白酶和淀粉酶等, 还成功地克隆了嗜碱性芽孢杆菌的一些基因如纤维素酶和木聚糖酶等的基因^[2-5], 并在大肠杆菌中得到表达。

然而, 纤维素酶等的基因在大肠杆菌中得到表达, 还不能清楚地说明大肠杆菌的转录翻译系统是识别嗜碱性芽孢杆菌的启动信号。分析两类生长环境完全不同的微生物体系的基因调控系统将有助于对基因表达规律的研究。

我们从分离嗜碱性芽孢杆菌入手, 运用启动子缺失质粒 pGA46, 克隆了带有嗜

碱性芽孢杆菌启动子的 DNA 片段, 并在大肠杆菌中得到表达。本文还对其中某些启动子的表达受到环境因子(如 pH, NaCl 浓度等)的调控现象进行了讨论。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

Bacillus sp. No.2 (染色体 DNA 供体菌, 本实验室从复旦校园土壤中分离, 种名待定)。

E. coli JF 1161 (pGA46) (复旦大学遗传所提供)。

E. coli C600 (thrB, leuB, pro, recBC) (质粒转化受体菌)。

(二) 培养基

1. 嗜碱性微生物基础培养基^[1]。

2. 酪蛋白培养基(检测蛋白酶的分泌)(g/L): 蛋白胨 5, 葡萄糖 1, 酵母膏 1, 干酪素 15, 柠檬酸三钠 4.5, 氯化钙(单独灭菌) 5.8, 琼脂 15, pH 10.0。

3. 黄豆粉发酵培养基(测蛋白酶活利用)(g/L): 黄豆粉 40, 玉米粉 60, 磷酸氢二钠 3, 碳酸钠(单独灭菌) 10, pH 10.0。

(三) 试剂

本文于 1986 年 7 月 14 日收到。

* 为本校 82 届学生。

酶: *Pst* I (上海药物所), *Hind*III (BRL), RNase (上海生化所), 溶菌酶(上海禽蛋二厂), T₄ 连接酶 (Boehringer)。

(四) 蛋白酶 pH-活力曲线测定

将 *Bacillus* sp. No. 2 接种于 5ml 碱性菌基础培养液中, 37°C 培养一天, 取 1ml 扩大至 40ml 玉米粉培养基中, 37°C 振荡 48 小时。4,000r/min 离心, 各取 0.5ml 上清液加入 9.5ml 不同 pH 的缓冲液 (pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0), 测定蛋白酶活力^[4]。

(五) 染色体 DNA 制备

按 Saito 和 Miura 方法^[7], 用酚、氯仿异戊醇、酒精沉淀处理二次, 用 50 μ g/ml RNase 于 37°C 30 分钟去除 RNA。染色体 DNA 溶于 TE 中。

(六) pGA46 质粒的大量制备

参照 Birnboim 和 Doly 的碱性抽提法^[8]。用 Sepharose 4B 凝胶过滤纯化质粒 DNA。

(七) 酶切、连接和转化^[9]

结 果

(一) 嗜碱性芽孢杆菌(*Bacillus* sp. No. 2) 基本特性

Bacillus sp. No. 2 细胞杆状, 好氧生长, 生长后期能形成芽孢, 在 pH 7.0—11.0 均能生长, pH 10.0 生长最好 (图 1)。该菌能分泌蛋白酶, 可在酪蛋白平板上形成透明圈。酶的最适 pH 在 10 左右 (图 2), 与最适生长 pH 一致。10m mol/L PMSF 不影响酶的活力, 而 10m mol/L EDTA 却能使酶的活力降低 50%, 表明 *Bacillus* sp. No. 2 所产生的是属于一类非丝氨酸型的金属蛋白酶 (metalloprotease)。

(二) *Bacillus* sp. No. 2 启动子的克隆及表达

本实验采用鸟枪法 (shotgun), 用限制性内切酶 *Pst* I 分别消化嗜碱性芽孢杆菌染色体 DNA 和启动子缺失质粒 pGA46, 在体外实现 DNA 重组, 转化大肠杆菌 (*E. coli* C600), 并以正选择法检出带有启动

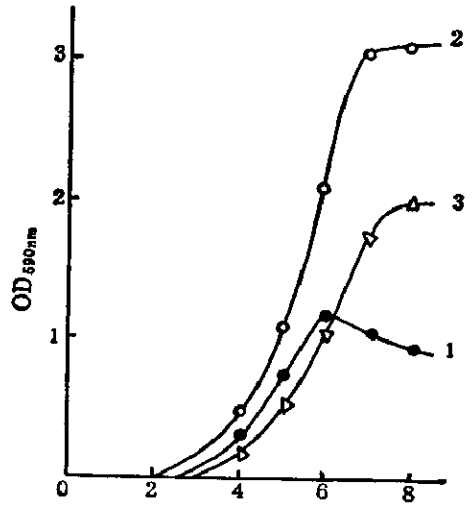


图 1 嗜碱性芽孢杆菌在不同 pH 下的生长
Fig. 1 Growth of *Bacillus* sp. No. 2 in medium with different pH
1. pH 7.0; 2. pH 10.0; 3. pH 11.0

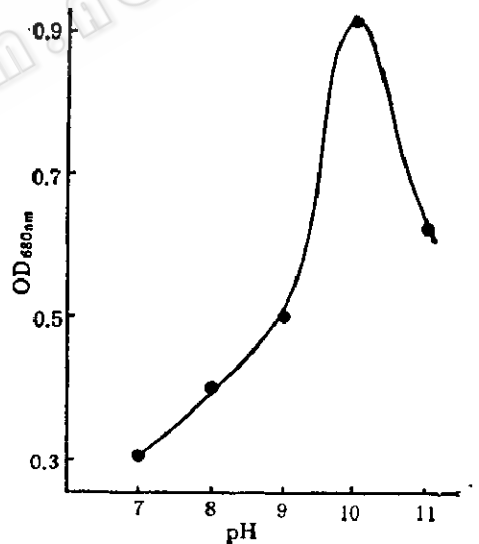


图 2 pH 对蛋白酶活力的影响
Fig. 2 Effect of pH on the proteinase activity

子片段的转化子 (图 3)。

pGA46^[10] 分子量为 2.9Md (约 4.5kb), 带有氯霉素抗性 (Cm^r) 基因及缺失启动子的四环素抗性基因 (Tc^r) (图 4)。 *E. coli* JF1161 (pGA46) 能抗 Cm , 但 Tc 敏感 (Tc 含量为 5 μ g/ml 时, 不能生长)。在 pGA46 的四环素抗性基因 5' 端的 *Pst*I、

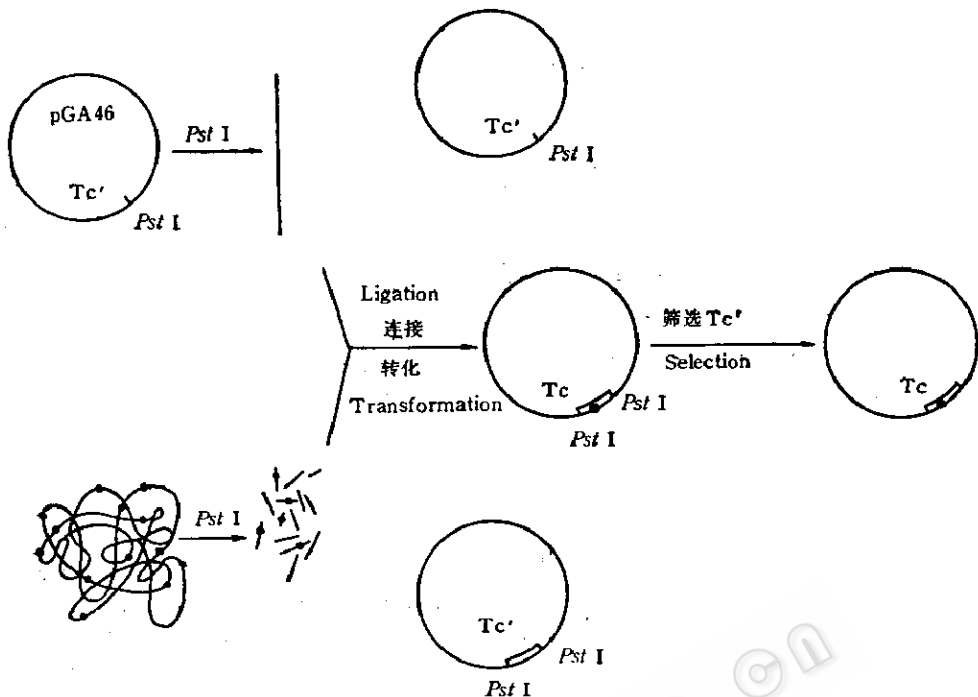


图3 从 *Bacillus* sp. No. 2 中克隆启动子片段

Fig. 3 Cloning of promoter-containing fragments from *Bacillus* sp. No. 2

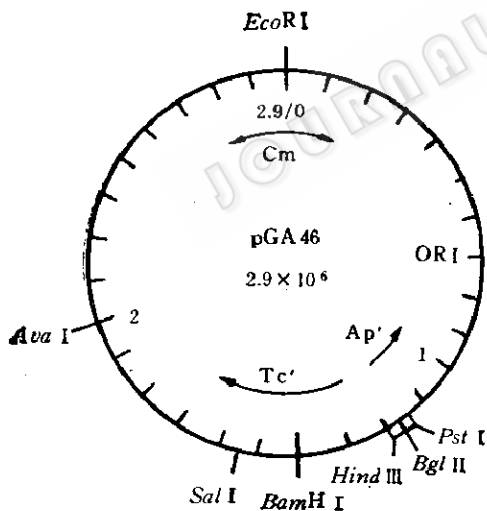


图4 pGA46 的酶切图谱

Fig. 4 Restriction map of pGA46

Bgl II 或 *Hind* III 切点插入带有启动子功能的 DNA 片段, *Tc*' 基因被激活而表达。

0.5 μ g 的 pGA46 及 2.5 μ g 的嗜碱性芽孢杆菌染色体 DNA 的 *Pst* I 酶切片段, 经 T₄ 连接酶连接, 并转化 *E. coli* C600,

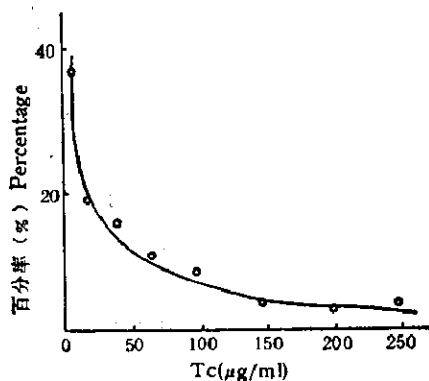


图5 转化子抗性水平分布

Fig. 5 Distribution of transformants resistance level

在 Cm 平板上得到 1260 个菌落, 然后依次点种于 Tc 含量分别为 5、10、20、40、60、100、150、200 和 250 μ g/ml 的 LB 平板上。这些转化子的抗性水平及其分布见图5。抗性水平在 Tc 5 μ g/ml 以上的转化子质粒中, 均插入了染色体 DNA 片段, 插入频率为 40.6%。抗性水平在 10 μ g/ml 以上的转

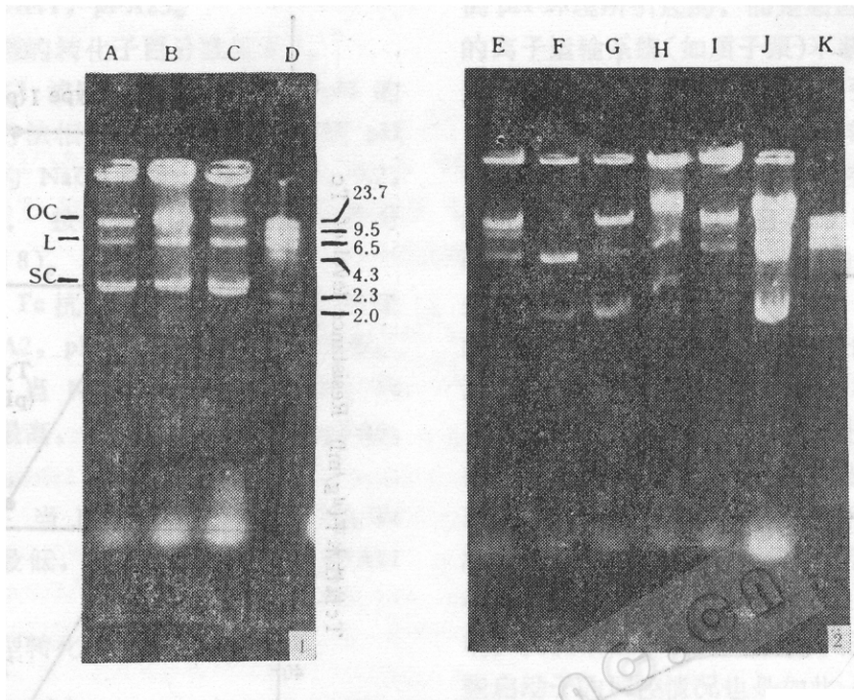


图6 pFA 及其转化子中重提的质粒 DNA 电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of pFA DNA and those reextracted from the transformants

1. A: pFA5 B: pFA6 C: pFA9 D: λ DNA *Hind* III 酶切
 2. E: pFA10 F: pFA11 G: pFA18 H: pFA23 I: pFA48 J: pFA73 K: λ DNA *Hind* III 酶切

化子,其 Tc 抗性基因 5' 端一般都有启动子插入,启动子的激活频率为 28.8%。有启动子激活 Tc^r 基因的杂合质粒,我们称之为 pFA。

从抗性水平分布曲线可以看出,转化子的 Tc 抗性大都在 100 μ g/ml 以内,当 Tc 浓度提高到 250 μ g/ml,还有 5 个转化子能生长,这比 pBR322 的 Tc 抗性还要高。含有启动子片段的启动强度不仅由该启动子的种类决定,而且还受其它因素影响,如启动子与 Tc^r 基因间的距离等。因此,Tc 抗性水平只表示一种大致趋势,并不能精确反映启动子的强弱。

(三) 杂合质粒 pFA 的特性及环境因子对其表达的影响

用快速质粒抽提,检查了 10 个带有启

动子的杂合质粒 (pFA),所克隆的启动子片段的长度在 500bp 到 5000bp 之间 (图 6)。

从这些杂合质粒中选了三个,重转化 *E. coli* C600,结果表明,重转化子的 Tc 抗性与其相应的转化子抗性水平一致。

我们任意挑选了 70 个转化子,初步分析了它们的表达与环境因子的关系。

1. pH 的影响:将这 70 个转化子点在不同 pH (pH 6.0, 7.0, 8.0) 和不同 Tc 浓度 (Tc: 0, 10, 20, 40, 60, 80 μ g/ml) 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养一天,检查各转化子在不同平板上的生长情况。统计结果,可以把转化子分为四类 (图 7)。

型 I: Tc 抗性水平与 pH 无关,如 pFA1, pFA3, pFA9 等。

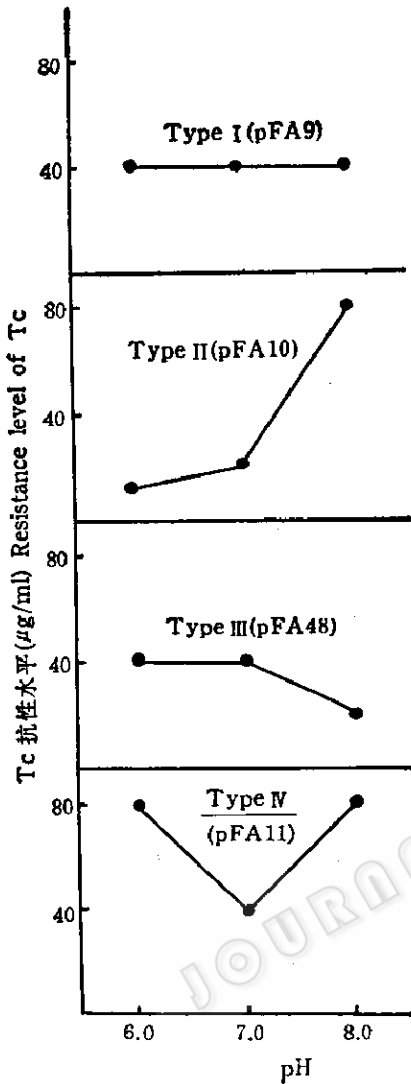


图7 pH对pFA表达的影响

Fig. 7 Effect of pH on the expression of pFA

表1 pH对抗性表达的影响

Table 1 Effect of pH on the expression of resistance

类型 Type	转化子数 Number of transformants	百分率(%) Percentage
I	46	65.7
II	21	30
III	1	1.4
IV	2	2.9
总数 Total	70	100

型 II: Tc 抗性水平随 pH 增大 (pH

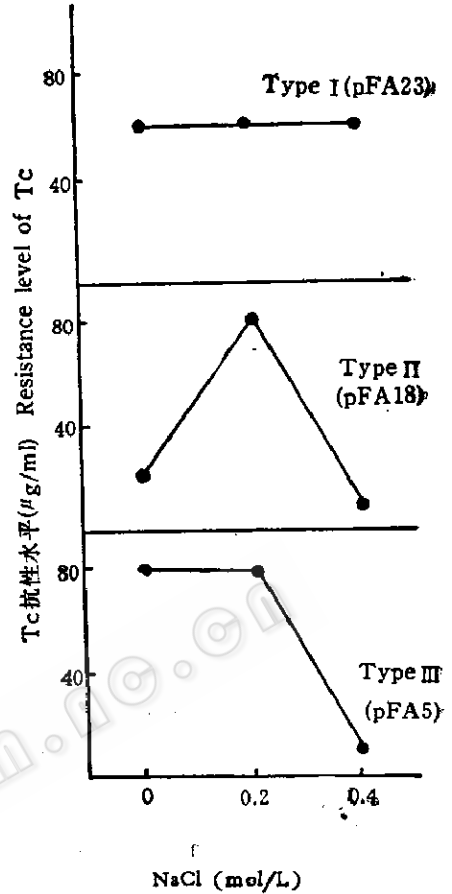


图8 NaCl浓度对pFA表达的影响

Fig. 8 Effect of NaCl concentration on the expression of pFA

表2 NaCl浓度对抗性表达的影响

Table 2 Effect of NaCl on the expression of resistance

类型 Type	转化子数 Number of transformants	百分率(%) Percentage
I	38	54.3
II	17	24.3
III	15	21.3
总数 Total	70	100

6.0—8.0) 而上升, 如 pFA4, pFA6, pFA10 等。

型 III: Tc 抗性水平随 pH 增加而下降, 如 pFA48。

型 IV: 当 pH 为 7.0 时, Tc 抗性水平

最低如 pFA11, pFA23。

各类型的转化子百分数见表 1。

2. NaCl 浓度的影响: 与检测 pH 的影响所用方法相似, 不同的是将不同 pH 换成不同的 NaCl 浓度 (NaCl: 0, 0.2, 0.4mol/L)。按结果可以把这些转化子分为三类(图 8)。

型 I: Tc 抗性水平与 NaCl 浓度无关, 如 pFA2, pFA3, pFA6, pFA23 等。

型 II: 当 NaCl 为 0.2mol/L 时, Tc 抗性水平最高, 如 pFA1, pFA4, pFA8, pFA18 等。

型 III: 当 NaCl 为 0.4mol/L 时, Tc 抗性水平最低, 如 pFA5, pFA9, pFA11 等。

各类型转化子的百分数见表 2。

讨 论

从所分析的嗜碱性芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. No. 2) 的启动子片段能在大肠杆菌中表达以及某些环境因子 (pH 和 NaCl 浓度) 对其表达的影响结果, 认为有两点值得深入讨论。

1. 生态环境差异不一定直接与染色体 DNA 的基因调控相关连。不同种之间的启动信号, 同源性越大, 则识别越容易, 表达频率也就越高。在我们的实验中, 嗜碱性芽孢杆菌的启动子在大肠杆菌中的激活频率为 28.8%, 反映了这两个菌的启动子顺序有很大的相似性, 启动子的识别方式也很相似。可以看出, 虽然嗜碱性芽孢杆菌生长于较碱的环境中, 但其基因表达方式上没有发生相应变化。这可能是由于嗜碱性微生物的细胞内环境较接近于中性 (pH 7.5—8.5), 而且与 RNA 多聚酶也是在 pH 8.0 的活力最大有关^[1]。根据有关报道表明^[1,11], 嗜碱性微生物之所以耐碱, 不是由于其细胞内的生化反应系统适应了

高 pH 环境所引起的, 而是通过细胞膜上的离子运输系统(如质子泵)不断进行离子交换, 保证内外环境的 pH 差而引起。

2. pH 及 NaCl 浓度等环境因子对嗜碱性芽孢杆菌启动子表达的调控: 从我们的实验结果来看, 不少启动子在 pH 8.0 时有较高的 Tc 抗性, 这似乎与嗜碱性微生物的内环境 pH 8.0 有关; 0.2mol/L 的 NaCl 是一般细菌最适生长的盐浓度, 这也许是不少启动子在 0.2mol/L NaCl 时有较高 Tc 抗性的一个原因。出现各种类型的影响曲线, 可能是由于这些启动子片段在嗜碱性芽孢杆菌中的功能不同, 受环境因子的调控亦不相同。至于为什么有一半以上的启动子不受 pH、NaCl 浓度的影响, 我们很难断定在嗜碱性芽孢杆菌内这些启动子的调控情况也是如此, 因为我们的研究是在大肠杆菌内进行的。

由于我们只做了一些初步工作, 因而, pH 及 NaCl 浓度对嗜碱性芽孢杆菌启动子的表达的影响究竟是直接的还是间接的, 是在转录水平上还是在翻译水平上, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Horikoshi, K. and T. Akiba: Alkalophilic Microorganisms, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 4—5; 9; 52—53; 80—82, 1982.
- [2] Sushihara, N. et al.: *J. Bacteriol.*, 158(2): 503—506, 1984.
- [3] Honda, H. et al.: *ibid.*, 161(2): 784—785, 1985.
- [4] Kudo, T. et al.: *ibid.*, 156(2): 949—951, 1983.
- [5] Honda, H. et al.: *J. Biochem.*, 95(5): 1485—1490, 1984.
- [6] 张龙翔等: 《生化实验方法和技术》, 高等教育出版社, p. 165—166, 1984.
- [7] Saito, H. and K. Muiro: *Biochimica et Biophysica Acta*, 72: 619—629, 1963.
- [8] Birnboim, H. and C. Doly: *Nucl. Acid Res.*, 6: 1513—1523, 1979.
- [9] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 104—106; 250—253, 1982.

[10] Gynheung, A. N. et al.: *J. Bacteriol.*, 140(2): 400—407, 1979.

[11] Koyama, N. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 812(1): 206—212, 1985.

CLONING OF PROMOTERS OF ALKALOPHILIC *BACILLUS* SP. NO. 2 AND EFFECT OF SOME FACTORS ON THE EXPRESSION

Chen Yongqing Song Daxin Xu Gangfeng

(Department of Biology, Fudan University, Shanghai)

A strain of alkalophilic *Bacillus* was isolated from soil, and its fundamental characteristics were examined. We cloned fragments containing promoter from its chromosome DNA with the vector of promoter-deletion plasmid pGA46 in *E. coli*, and found them expressing well. Some of these promoters were

controlled by environmental factors such as pH and NaCl concentration.

Key words

Alkalophilic *Bacillus*; Promoter; Expression