微生物学报 37(2): 101～106, 1997
Acta Microbiologica Sinica

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*

王红革　李文清　徐柏年　罗进贤**
（中山大学生命科学学院　广州　510275）

摘　要　采用PCR技术扩增了sacB基因的启动子－信号序列，并将扩增的序列重组进含地衣芽孢杆菌α－淀粉酶基因的质粒载体上构建了含α－淀粉酶基因的分泌型表达载体pSA60。将pSA60转化枯草芽孢杆菌QB1098后，α－淀粉酶基因在sacB基因启动子－信号序列的调控和蔗糖的诱导下获得表达，表达产物分泌至胞外。

关键词　诱导表达，α－淀粉酶基因，地衣芽孢杆菌，枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌由于其安全性和分泌胞外蛋白的特点，被认为是表达和分泌异源蛋白的理想受体[1]。但外源基因在枯草芽孢杆菌中的表达水平一般比大肠杆菌低，这主要是枯草芽孢杆菌可向胞外分泌高浓度的蛋白酶以致影响了表达产物的稳定性。近年来Doi等构建的双蛋白酶和三蛋白酶缺陷的枯草芽孢杆菌DB104及DB403[2]，有助于提高分泌蛋白的稳定性。此外，某些外源基因(如心房肽基因等)的表达产物对宿主细胞还存在毒害作用。构建诱导型表达／分泌系统将有助于解决枯草芽孢杆菌系统存在的问题。果聚糖蔗糖酶(levansucrase)是芽孢杆菌分泌的一种胞外酶，由sacB基因编码，其表达受蔗糖的诱导[3]。利用sacB基因构建枯草芽孢杆菌的表达系统除了可被蔗糖诱导外还可利用表达周期的不同(sacB基因是在对数生长期表达的，而多数的蛋白酶基因则是在静止期表达的)避免蛋白酶对外源基因产物的降解。本文报道sacB基因启动子－信号序列的克隆、诱导型表达／分泌载体的构建和地衣芽孢杆菌α－淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的诱导表达。

1　材料和方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α (sup E44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, Thi1 relA1)是PCR产物扩增的受体，由本室保存。枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) QB1098 (amy)是质粒扩增和基因表达受体，由Steinmetz博士提供。质粒pCR™ II (Km^r, Amp^r)是专门用于克隆PCR产物的载体质粒，购自Invitrogen公司。

* 国家自然科学基金资助。

** 通讯作者。

本文于1996年1月18日收到。

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

pUBA20是含地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)α－淀粉酶基因的枯草芽孢杆菌质粒，为本室构建[4]。

1.2 培养基

细胞培养和大肠杆菌转化用L－肉汤培养基，枯草芽孢杆菌转化用GMI、GMII培养基[5]，发酵用MMCH培养基[6]。

1.3 主要试剂

本实验所用的限制酶、T4 DNA连接酶等为GIBCO－BRL公司产品，核糖核酸酶、氨苄青霉素等购自Sigma公司，其余为国产分析纯试剂。PCR扩增所用试剂均采用Invitrogen公司的试剂盒。

1.4 DNA的提取与操作

枯草芽孢杆菌168染色体DNA的提取按Marmur的方法[7]。质粒的快速检测和少量制备以及DNA的酶切、连接、大肠杆菌转化均按Sambrook的方法[8]。枯草芽孢杆菌转化参照Spizizen的方法[5]。

1.5 PCR扩增及扩增产物的纯化

按Invitrogen公司试剂盒提供的方法。

1.6 PCR产物的DNA序列分析

参照Sanger的末端终止法[9]

1.7 α－淀粉酶活力测定

DNS法[10]。

2 实验结果

2.1 sacB基因启动子和信号序列的克隆

2.1.1 扩增引物的设计与合成：根据已发表的sacB基因的全序列[3]，我们设计了两个引物(图1)。

引物1： 5'-CGGGATCCATCACATATACCTGCCGT-3'
(5'端) BamHI

引物2： 5'-GCGAATTCACTGCAGTCGCAAACGCTTGAGTTGC-3'
(3'端) EcoRI PstI

图1 引物的设计

Fig. 1 Primer design (dark letters indicate sequence unmatched with sacB gene)

引物设计的原则是：(1)在5′端上游加一个BamHI位点，在3′端引物下游加PstI和EcoRI位点，PstI位点是为了连接地衣芽孢杆菌α－淀粉酶基因的编码序列，EcoRI位点是为了连接另一个基因而设；(2)使α－淀粉酶基因接到3′端引物PstI位点后，基因的读码框架是正确的；(3)在BamHI及EcoRI位点前设有保护性碱基CG。合成的引物经HPLC纯化后在凝胶电泳上为单一条带。

2.1.2 sacB基因启动子－信号序列的扩增与克隆：以1μg枯草芽孢杆菌168染色体

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

DNA作模板，通过25个循环的PCR反应，扩增产物经凝胶电泳鉴定为一条单一的带，表明我们得到的是单一的扩增产物，约560bp(图2)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后直接克隆至质粒pCR™II上获得重组质粒pCR™II S（构建图略）。

2.1.3 PCR扩增产物的DNA序列分析：采用Sanger的双脱氧末端终止法将pCR™II的PCR产物直接进行双链DNA序列分析，结果如图3。结果显示，PCR扩增产物与发表的sacB基因5′端从第17 ～ 551位碱基的序列完全相同。它包括sacB基因的启动子、200bp的类似转录终止信号的序列、核糖体结合位点及编码29个氨基酸的信号序列。

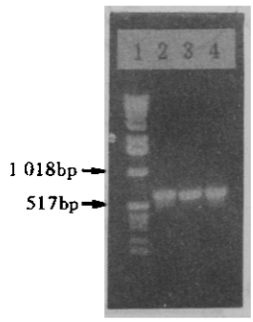

图2　PCR扩增产物的电泳图
1. 1kb DNA分子量标准；
2～4. PCR扩增产物.
Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products
1. 1kb DNA ladder;
2～4. PCR products.

2.2　诱导型表达和分泌载体pSA60的构建

质粒pUBA20有一段切去了启动子和信号序列的地衣芽孢杆菌α－淀粉酶的编码序列(基因)，位于PstI及Hind III位点之间。为了构建含α－淀粉酶基因的诱导型表达载体，用限制酶BamHI和PstI双酶切质粒pCR™II S，用琼脂糖凝胶电泳分离560bp的sacB基因的启动子－信号序列片段，同时用BamHI和PstI双酶切质粒pUBA20，并用异丙醇沉淀法除去小片段DNA。然后将sacB基因的启动子－信号序列与BamHI和PstI双酶切的pUBA20大片段连接，连接产物转化枯草芽孢杆菌QB1098(amy)，筛选卡那霉素抗性转化子。经转化子质粒快速检测和酶切电泳分析鉴定后，获得含sacB基因启动子－信号序列和地衣芽孢杆菌α－淀粉酶基因的重组质粒，命名为pSA60(图4)和(图5)。

BamHI

5'-CGGGATCCATCACATATACCTGCCGTTCACTATTATTTAGTGAATGAGATATTATGAT
ATTTTCTGAATTGTGATTAAAAAGGCAACTTTATGCCCATGCAACAGAAACTATAAAAA
ATACAGAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTTAGTTCTTTAGGCCCGTAGTCTGCAA
ATCCTTTTATGATTTTCTATCAAACAAAAGAGGAAAATAGACCAGTTGCAATCCAAACG
AGAGTCTAATAGAATGAGGTCGAAAAGTAAATCGCGCGGGTTTGTTACTGATAAAGCAG
GCAAGCAATAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGTATACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTT
TAGGTCTTTTTTTATTGTGCGTAACTAACTTGCCATCTTCAAACAGGAGGGCTGGAAGAA
GCAGACCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGACATGAACG ATG AAC ATC AAA AAG
TTT GCA AAA CAA GCA ACA GTA TTA ACC TTT ACT ACC GCA CTG CTG GCA GGA
GGC GCA ACT CAA GCG TTT GCG ACTGCAGTGAATTCGC-3'

-1 ↑　PstI　EcoRI

图3　PCR扩增产物的DNA序列分析
Fig. 3　Nucleotide sequence of PCR amplified products
Sequence with terminator features is showh in arrowhead, ribosome binding site is underlined and sequence unmatched with sacB gene is indicated by dark letters

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

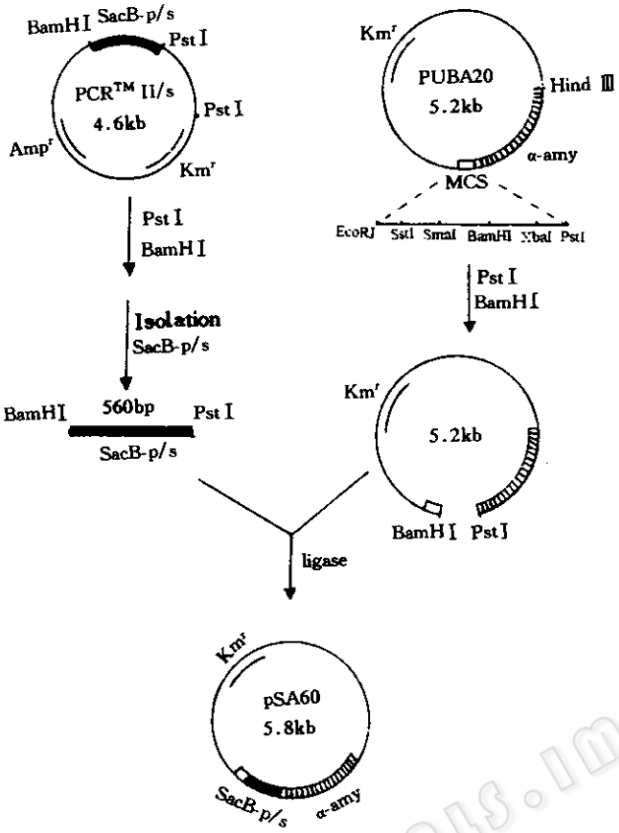

图4 诱导型表达载体 pSA60 的构建

Fig.4 Construction of inducible expression vector pSA60

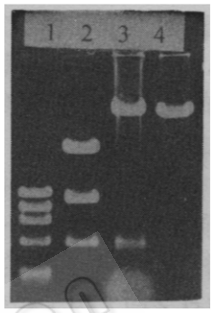

图5 重组质粒 pSA60 的酶切分析

Fig.5 Restriction analysis of recombinant plasmid pSA60

1. Φ x174RF DNA /hae III Fragments;
2. pCR™ II /BamHI + Pst I;
3. pSA60 /BamHI + PstI;
4. pUBA20 /BamHI + PstI.

2.3 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

为了确证质粒 pSA60 中 sacB 信号序列与地衣芽孢杆菌 α－淀粉酶基因的编码序列之间的读码框架是正确的，我们测定了 sacB 与α－淀粉酶基因连接处的 DNA 序列，结果如图 6。

```
                                        ------→amylase          +1
  ---gly  ala  thr  gln  ala  phe  ala  thr  ala  ala  ala  ala  ala  asn  leu  asn ---
5' ---GGC GCA ACT  CAA GCG TTT  GCG ACT GCA GCA GCG GCG  GCA AAT CTT  AAT--- 3'
                                sacB ←------┘ PstI
```

图 6 质粒 pSA60 中 sacB 信号序列与 α－淀粉酶基因接口处的序列

Fig.6 Nucleotide sequence of the junction between the sacB signal and α－amylase gene

在 sacB 信号序列与 α－淀粉酶基因连接处的读码框架是正确的。在此结构中仍保留了 α－淀粉酶信号肽的 4 个氨基酸，接下去才是成熟 α－淀粉酶的编码序列。

将枯草杆菌 QB1098 (pSA60) 接种于 LB 培养基试管中，37 ℃ 培养过夜，次日转种

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

于两个盛有MMCH培养基的三角瓶中。2h后向其中一瓶加入蔗糖溶液使其终浓度达到2%，定时取样，离心取上清液用DNS法测定酶活，结果如图7。接种后6h，α－淀粉酶基因开始被诱导表达，8h后经蔗糖诱导的酶活是未诱导的对照组的6倍；24h达到10倍。表明地衣芽孢杆菌α－淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌sacB基因的启动子和信号序列的调控之下在枯草芽孢杆菌中可被蔗糖诱导表达而且产物可分泌至胞外。

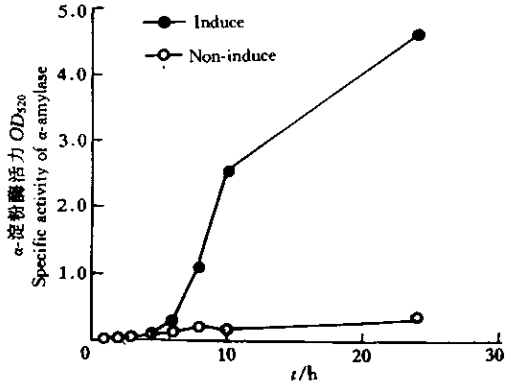

图7　地衣芽孢杆菌α－淀粉酶在枯草杆菌中的蔗糖诱导表达
Fig.7　Sucrose induced expression of *B. lichiformis* α－amylase in *B. subtilis*

3　讨论

本研究采用PCR技术扩增/克隆了枯草芽孢杆菌168染色体的sacB基因启动子和信号序列，并利用其构建含地衣芽孢杆菌α－淀粉酶基因的诱导型表达和分泌载体，同时证明α－淀粉酶基因可被蔗糖诱导表达，为其他外源基因特别是真核蛋白基因在枯草芽孢杆菌中的诱导表达打下了基础。

果聚糖蔗糖酶(sacB)诱导系统是芽孢杆菌两个诱导系统之一，sacB基因的表达除受蔗糖诱导外，还为degQ、degU和degS等调控基因增强，其增强作用可达几十倍。sacB基因表达调控的研究对实现外源基因在芽孢杆菌中高效的诱导表达有重要的理论意义和应用前景。

参　考　文　献

[1] Priest F G. *Bacteriol Rev*, 1977, **41**(4):711 ~ 753.
[2] Kanamura F, Doi R H. *J Bacteriol*, 1984, **160**(1):442 ~ 444.
[3] Steinmetz M, Soq D L, Amyrich S *et al*. *Mol Gen Genet*, 1985, **200**(1):220 ~ 228.
[4] 王义良，罗进贤，胡晋新，李文清. 中山大学学报，1992, **31**(2):8 ~ 13.
[5] Spizizen J. *Proc. Nat Acad Sci USA*, 1958, **44**(3):1072 ~ 1078.
[6] Kunst F, Paseal M. Lepesant. K. *et al*. *J Bacteriol*, 1988, **170**(1):5093 ~ 5101.
[7] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, **3**(2):208 ~ 218.
[8] Sambrook J, Fritsch E. F, Marriatis T J. Mol Cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16 ~ 50.
[9] Sanger F, Carlson A R, Barrell B G *et al*. *J Mol Biol*, 1980, **143**(1):161 ~ 165.
[10] Griffin P J, Fogarty U. *J Appl Chem Biotechnol*, 1973, **23**(2):297 ~ 330.

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

INDUCIBLE EXPRESSION OF α-AMYLASE GENE OF *BACILLUS LICHENIFORMIS IN BACILLUS SUBTILIS**

Wang Hongge Li Wenqing Xu Bainian Luo Jinxian**

(*School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou* 510275)

Abstract Construction of inducible expression-secretion system is helpful to overcome the degradation of foreign gene product (s) by *Bacillus* extracellular proteases and harmful effect of some gene products to the host. The PCR amplification of promoter and signal sequence of sacB gene, construction of inducible expression and secretion vector with amplified sequences and the inducible expression of *Bacillus licheniformis* α-amylase gene in *Bacillus subtilis* by sucrose were reported.

Key words Inducible expression, α-amylase gene, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*

* Supported by China National Science Foundation.

** Correspoding autor.

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