

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (1) :89 - 96; 4 January 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.011

嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 表达载体的构建

刘文侠^{1,2}, 李金山¹, 高成华¹, 薛燕芬^{1*}, 马延和¹

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】构建可以在嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 中表达外源基因的表达载体。【方法】以枯草芽孢杆菌表达质粒 pHCMC04 为基本骨架, 删除木糖诱导的启动子和木糖阻遏蛋白基因, 分别插入枯草芽孢杆菌组成型强启动子 P43 和嗜碱芽孢杆菌 N16-5 的组成型启动子 P_{EF}, 构建表达载体 pABN165P43 和 pABN165P_{EF}; 将绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为报告基因连接至表达载体得到 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165P_{EF}-*gfp*, 利用原生质体转化法将其转化至 *Bacillus* sp. N16-5, 通过荧光显微镜和多功能荧光读板仪检测报告基因的表达情况。【结果】所构建的表达载体 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165P_{EF}-*gfp* 可以在 *Bacillus* sp. N16-5 中表达报告基因 *gfp*, 荧光定量数据显示, 在 7.5 h 左右开始检测到绿色荧光蛋白的表达, 从 7.5 h 到 12 h 荧光强度随时间增长迅速并在 12 h 左右达到最大, 最大荧光值在 7000 左右。【结论】成功构建了 2 个嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 表达载体, 实现了外源基因在嗜碱芽孢杆菌中的表达。

关键词: *Bacillus* sp. N16-5, 表达载体, 嗜碱芽孢杆菌

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 01-0089-08

嗜碱微生物是最适生长 pH 在 9 以上, 而在近中性环境下不能生长或生长缓慢的一类微生物^[1], 它对碱性环境特殊的适应机制和丰富的碱性酶资源一直是科学研究的兴趣所在^[2-3]。目前对嗜盐碱基因和蛋白的研究主要通过基因克隆、外源系统中表达、体外鉴定来进行^[4-5], 但是并非所有的嗜盐碱基因都能在外源系统中有效表达, 比如某些 pH 依赖的基因, 因此构建嗜碱菌的表达系统对研究嗜盐碱基因的功能是必要的。并且要从分子水平上进行嗜碱菌的生理机制、遗传发育和生长代谢等研究, 相应的表达系统也是不可或缺的。然而对于广泛分布的

嗜碱菌而言, 由于其生理特殊性和可操作载体的缺乏, 使得其遗传操作系统的研究进展缓慢, 目前只有很少的嗜碱菌建立了遗传操作系统, 主要集中于两株嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 和 *Bacillus halodurans* C-125^[6-7]。

嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 是本课题组从内蒙古乌杜淖碱湖筛到的一株兼性嗜碱芽孢杆菌, 最适生长 pH 为 10, 能够产生多种碱性水解酶和有机酸^[8-9], 是研究嗜碱菌嗜碱机制和工业应用的理想菌株。目前我们对 *Bacillus* sp. N16-5 已经进行了基因组、转录组和蛋白质组等方面的研究^[10], 而遗

基金项目: 国家“973 项目” (2013CB733900); 国家“863 计划” (2011AA02A206)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807616; E-mail: xueyf@im.ac.cn

作者简介: 刘文侠 (1987 -), 女, 山东莱芜人, 硕士研究生, 主要从事嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 表达系统的研究。E-mail: jingsi.xinya.2008@163.com

收稿日期: 2013-05-05; 修回日期: 2013-06-19

传操作系统的缺乏限制了我们对 *Bacillus* sp. N16-5 的深入研究。

Bacillus sp. N16-5 没有内源质粒,不能形成自然感受态,目前常用的电击转化和化学转化方法也未能实现转化,使得构建菌株 N16-5 的遗传操作系统具有一定难度。本课题组前期工作结合甲基化策略和硬琼脂复生培养基实现了 *Bacillus* sp. N16-5 原生质体转化,成功地转入了 pHP13, pBK15, pMK4 和 pHCMC04 等质粒^[11]。然而尽管这些质粒可以在 N16-5 菌中实现复制,但将目标基因插入这些质粒中并未能实现表达。我们知道表达载体是要具备合适的复制起点、标记基因、多克隆位点、启动子、核糖体结合位点和终止子等元件。我们分析上述质粒在 N16-5 菌不能表达目标基因的原因,最有可能是其中的启动子和核糖体结合位点不能被 N16-5 菌很好识别。在已经成功转化至 *Bacillus* sp. N16-5 的质粒

中,pHCMC04 是一个大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体,在芽孢杆菌中使用的复制区来自 pBS72,是一种 Theta 型复制子,遗传稳定性较好,在重组基因下游含有有效终止转录的 *trpA* 终止子,是重组表达系统构建的良好材料^[12-13]。

本研究以质粒 pHCMC04 为基础,从启动子和核糖体结合位点等角度对 pHCMC04 进行改造,构建了可以在嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 表达外源基因的表达载体,以绿色荧光蛋白作为报告基因,对该表达载体进行了验证。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:实验用到的菌株和质粒见表 1。

表 1. 本实验中用到的菌株和质粒

Table1. Strains and plasmids used in this work

strains and plasmid	description	reference or sources
strains		
<i>Escherichia coli</i> trans5 α	F- ϕ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rk -, mk +) <i>supE44</i> λ - <i>thi</i> -1 <i>gyrA96 relA1 phoA</i>	TransGen
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i> , containing a strong constitutive promoter P43	[14]
<i>Bacillus</i> sp. N16-5	a facultative alkaliphilic strain	Lab storage
plasmids		
pBL165	A plasmid carrying <i>gfp</i>	[15]
pHCMC04	8.1 kb; Amp ^R , ColE1 origin in <i>Escherichia coli</i> ; Cm ^R , pBS72 origin in <i>Bacillus</i> sp	[12]
pABN165	pHCMC04 removing complete xylose-inducible cassette and inserting multiple cloning site	This study
pABN165P _{EF} - <i>gfp</i>	pABN165 with promoter P _{EF} and <i>gfp</i>	This study
pABN165P43- <i>gfp</i>	pABN165 with promoter P43 and <i>gfp</i>	This study

1.1.2 试剂和仪器:本实验扩增基因所用的高保真酶 *Pyrobest*TM DNA Polymerase, 检测所用的 DNA 聚合酶 *rTaq* DNA Polymerase 以及 DNA ladder marker 购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;质粒提取试剂盒,产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) trans5 α 感受态购自北京全式金生物技术有限公司;其它试剂均为分析纯。所用仪器:Axio imager A1 正置荧光显微镜和 SynergyTM H4 多功能荧光读板仪。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基用于培养大肠杆菌和枯草芽孢杆菌, Horikoshi-I^[1] (NaCl 浓度为 1%) 培养基用于培养嗜

碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5, 培养温度为 37 $^{\circ}$ C。Neutral complex medium^[6], SMMP 缓冲液, PEG8000 用于 *Bacillus* sp. N16-5 原生质体制备和转化^[11], SA5 培养基用于原生质体复生^[11]。LB 培养基中加入终浓度为 100 μ g/mL 氨苄青霉素用于培养大肠杆菌重组菌, Horikoshi-I^[1] (NaCl 浓度为 1%) 培养基加入终浓度为 3 μ g/mL 的氯霉素用于培养 *Bacillus* sp. N16-5 重组菌。

1.3 基因扩增

本文所用 PCR 扩增引物见表 2。以质粒 pBL165 为模板,以引物 GFPF 和 GFPR 扩增绿色荧光蛋白 GFP 基因 *gfp*;以 *Bacillus subtilis* 168 的基因组为模板,以引物 P43F 和 P43R 扩增 *Bacillus subtilis*

组成型强启动子 P43; 对嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 基因组序列和不同碳源条件转录组数据进行分析, 根据转录水平和基因结构选择了 1 个可能的组成型强启动子 P_{EF}, 并利用启动子预测软件 Softberry-BPROM 进行初步鉴定, 证实其结构符合启动子的特征, 设计相应引物 P_{EF}F 和 P_{EF}R, 以 *Bacillus* sp. N16-5 基因组为模板扩增 P_{EF} 启动子。本实验测序所用的引物为 spF 和 spR。

基因扩增用的 PCR 反应体系为: 50 μ L 反应体系中加入 10 \times *Pyrobest* buffer II 5 μ L, 2.5 mmol/L 的 dNTPsmixture 4 μ L, 浓度为 10 μ mol/L 的正反向引物各 2 μ L, 模板 10 - 100 ng, *Pyrobest*TM DNA Polymerase 0.25 μ L, 加无菌去离子水至 50 μ L。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min/kb, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

表 2 本实验所使用的引物
Table 2 Primers used in this study

primer	sequence (5'→3') ^a	restriction site	size/bp
GFPP	CGCGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAC	<u>Bam</u> H I	28
GFPR	ACGGGACGCTCTGCAGGCTGGACATT	<u>Aat</u> II	26
P43F	TGACCGGTAGCTTCCGTCATGCAGGCC	<u>Age</u> I	27
P43R	TGACTAGTCTATAATGGTACCGCTATCACTT	<u>Spe</u> I	31
P _{EF} F	GGCCATGAGCTCCGAGATATATTGTCTCACTAACC	<u>Sac</u> I	35
P _{EF} R	ACGGTACCGATCGAAATCCTCCTTATTGTTTAA	<u>Kpn</u> I	33
spF	CTGGCGAAAGGGGATGTGCTGC	-	23
spR	TAAGCTATAAACTTTTCAGTTGCAG	-	25

a. Restriction site are underlined.

1.4 表达载体的构建

对 pHCMC04 的序列进行分析, 发现其核糖体结合位点为 AAAGGGGAAA。而对 N16-5 菌基因组序列特征分析显示该菌有较多的芽孢杆菌最典型的 SD 序列 **GGAGG**^[16], 因此我们设计了内含芽孢杆菌典型的 SD 序列 GGAGG 的多克隆位点序列, 合成的寡核苷酸序列 ON1: 5'-CACCGGTACCAGGAGGATTTCCGATACTAGTAGGAGGATTTCCGATG-3' 和 ON2: 5'-GATCCATCGAAATCCTCCTACTAGTATCGAATCCTCCTGGTACCGGTGAGCT-3'。复性后, 形成带有 SD 序列的多克隆位点片段。复性条件: 浓度为 100 mmol/L 的 ON1 和 ON2 等体积混合, 94 $^{\circ}$ C 保持 10 min, 自然降温。该多克隆位点片段具有单一限制性酶切位点 *Age* I, *Kpn* I, *Spe* I, 两端带有 *Sac*I 和 *Bam*HI 形成的粘性末端。pHCMC04 经 *Sac*I 和 *Bam*HI 双酶切, 去掉木糖诱导的启动子 P_{xyIA} 和木糖阻遏蛋白基因 *xyIR*, 将该酶切处理的载体 pHCMC04 和多克隆位点片段以适当比例混合, 做连接反应, 形成载体 pABN165, 以此载体为骨架, 分别插入启动子 P43 和 P_{EF}, 形成表达载体 pABN165P43 和 pABN165P_{EF} (图 1)。将报告基因 *gfp* 经 *Bam*H I 和 *Aat* II 双酶切, 连接到表达载体 pABN165P43 和 pABN165P_{EF} 上, 形成重组表达载体 pABN165P43-*gfp*

和 pABN165P_{EF}-*gfp*。

1.5 重组 *Bacillus* sp. N16-5 的构建

重组质粒 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165P_{EF}-*gfp* 转化 *Escherichia coli* trans5 α (具体方法参见 trans5 α 感受态说明书), 进行菌落 PCR 初步验证和测序验证。重组质粒利用原生质体转化法转化至 *Bacillus* sp. N16-5, 并用菌落 PCR 验证表达体系的构建情况, 具体方法参照文献 [11]。

1.6 *Bacillus* sp. N16-5 表达系统的检测

1.6.1 荧光显微镜检测: 对含有表达载体 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165P_{EF}-*gfp* 的 *Bacillus* sp. N16-5, 挑取单菌落, 转至 4 mL 含有终浓度为 3 μ g/mL 的氯霉素的 Horikoshi-I^[1] (NaCl 浓度为 1%) 培养基中培养过夜。各取 1 mL 菌液离心收集菌体, 用相同体积的 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 2 - 3 次, 用 500 μ L 重悬菌体, 取 5 μ L 菌悬液滴在载玻片中央, 压紧盖玻片, 在荧光显微镜油镜下观察荧光图像, 激发光范围为 460 - 480 nm, 发射光范围为 505 - 530 nm。实验以转入载体 pABN165-*gfp* 的 *Bacillus* sp. N16-5 作为对照。

1.6.2 荧光定量: 将在荧光显微镜下检测到荧光的阳性重组菌以 1% 的接种量接至 100 mL Horikoshi-I^[1] (NaCl 浓度为 1%) 培养基中培养, 每隔 1 - 2 h

取样 1 次,测定 OD_{600} ,另取菌液 1 mL,离心收集菌体,用相同体积 pH 7.4 的 PBS 缓冲液,洗涤 2-3 次,用 1 mL PBS 重悬菌体,各取 200 μ L 至 96 孔板中,并在激发光为 481 nm 和发射光为 507 nm 的条件下测定荧光强度。将报告基因 *gfp* 插入到

pABN165 多克隆位点构建载体 pABN165-*gfp*,由于其 *gfp* 上游没有启动子,不能表达荧光蛋白,实验中以含有载体 pABN165-*gfp* 的 *Bacillus* sp. N16-5 作对照。每个样品 3 个平行,实验重复 3 次。

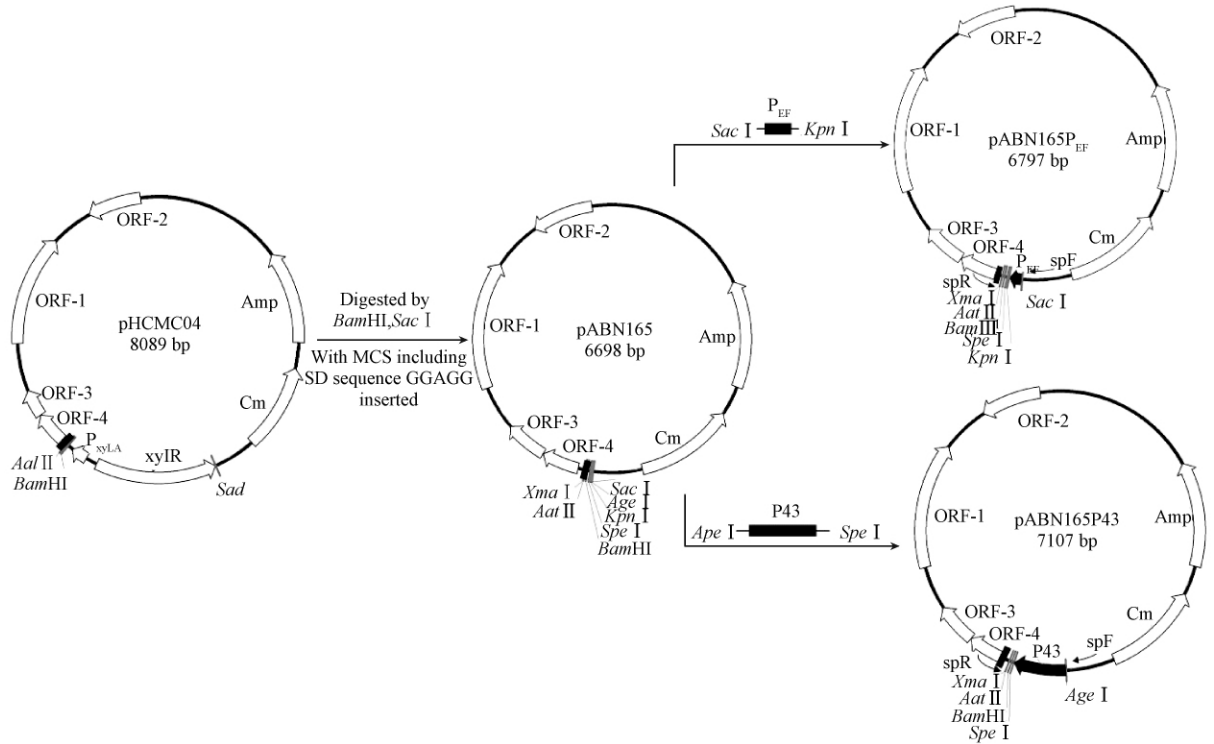


图 1. 表达载体 pABN165P43 和 pABN165PEF 的构建示意图

Figure 1. Genetic and restriction map of the pABN165 expression vectors.

All vectors replicate both in *E. coli* and in *Bacillus* sp. N16-5 and contain the efficient transcriptional terminator *trpA* as indicated by a bar. The cloning sites immediately downstream of the promoters and sequencing primers (spF and spR) are indicated.

2 结果和分析

2.1 基因扩增

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示,PCR 产物 P_{EF} , P43 和 *gfp* 的大小与预期一致,图 2 是启动子 P_{EF} 和 P43 的扩增结果。

2.2 表达载体和重组表达体系的构建

连接产物转化 *Escherichia coli* trans5 α 后,利用菌落 PCR 验证和测序验证,证明重组表达载体 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165PEF-*gfp* 构建成功。构建成功的重组载体转化 *Bacillus* sp. N16-5,经菌落 PCR 验证,证明重组载体成功转入嗜碱菌 N16-5。菌落 PCR 验证 pABN165PEF-*gfp* 所使用的引物是

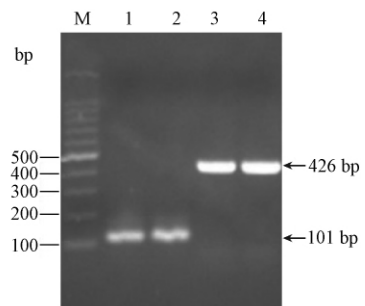


图 2. 扩增的核苷酸片段的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2. Electrophoresis of PCR products. M:100 bp DNA ladder marker, lane 1-2: P_{EF} , lane 3-4: P43.

P_{EF} 和 GFPR,验证 pABN165P43-*gfp* 所使用的引物是 P43F 和 GFPR。图 4 是重组载体转化 *Bacillus* sp. N16-5 的菌落 PCR 验证结果。

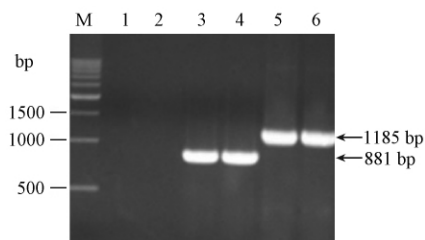


图 3. 表达载体转化 *Bacillus* sp. N16-5 的菌落 PCR 验证

Figure 3. Electrophoresis of colony PCR confirming the transformation of expression vector into *Bacillus* sp. N16-5. M: 500 bp DNA ladder marker, lane 1: blank control without any DNA template, lane 2: negative control using N16-5 transformed by plasmid pHCMC04 as template, lane3-4: PEF-gfp, lane5-6: P43-gfp.

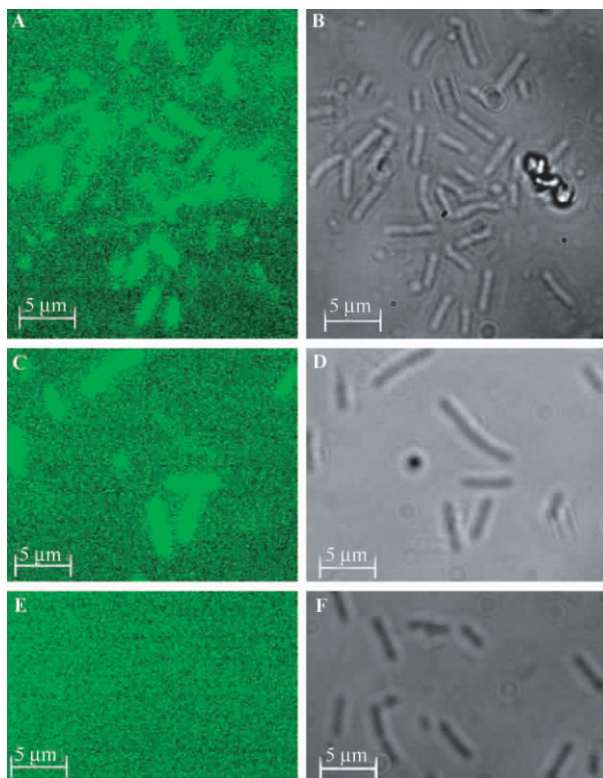


图 4. 绿色荧光蛋白基因在 *Bacillus* sp. N16-5 中的表达

Figure 4. Expression of *gfp* in *Bacillus* sp. N16-5. A, B: *Bacillus* sp. N16-5 with pABN165P_{EF}-*gfp*; C, D: *Bacillus* sp. N16-5 with pABN165P43-*gfp*; E, F: *Bacillus* sp. N16-5 with pABN165-*gfp*; A, C, E: Fluorescent images; B, D, F: Differential interference contrast microscopic images.

2.3 *Bacillus* sp. N16-5 重组表达体系的鉴定

2.3.1 荧光显微镜检测: 对 *Bacillus* sp. N16-5 重组菌在荧光显微镜下进行荧光检测, 结果如图 5 所示,

含有 pABN165-*gfp* 的 *Bacillus* sp. N16-5 检测不到荧光, 含有表达载体 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165P_{EF}-*gfp* 的 *Bacillus* sp. N16-5 在荧光显微镜下可以观察到荧光, 说明报告基因 *gfp* 已成功表达。

2.3.2 表达强度检测: 利用多功能荧光读板仪对重组表达质粒 pABN165P43-*gfp* 和 pABN165P_{EF}-*gfp* 在 *Bacillus* sp. N16-5 中的表达强度进行了检测。图 5-A 显示了菌体浓度 (OD_{600}) 随时间的变化, 图 5-B 显示了荧光强度随时间的变化。图 6 显示了表达活性随时间的变化。

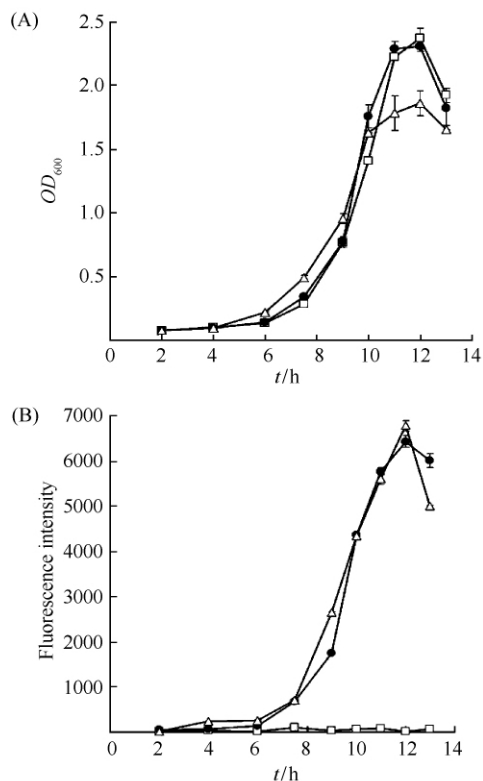


图 5. 菌体浓度和荧光强度随时间的变化

Figure 5. Bacteria concentration and fluorescence intensity change over time. A: bacterial growth, B: absolute fluorescence. Square □: *Bacillus* sp. N16-5 carrying pABN165-*gfp*, Circle ○: *Bacillus* sp. N16-5 carrying pABN165P_{EF}-*gfp*, Triangle Δ: *Bacillus* sp. N16-5 carrying pABN165P43-*gfp*.

由图 5-A 菌体浓度随时间的变化可以看出, 对照组和含有表达载体的重组菌的生长趋势大体一致, 前 6 h 基本处于生长延滞期, 从 6 h 开始, 菌体进入对数生长期, 11 - 12 h, 菌体生长速度减慢, 进入稳定期。由图 5-B 荧光强度随时间的变化可以看出对照组基本检测不到任何荧光, 含有表达载体的重组菌在前 6 h 基本检测不到荧光, 说明此时绿色荧

光蛋白可能尚未表达;从 6 h 开始,荧光随时间迅速增强。11 - 12 h, 荧光强度仍然继续增加,并在 12 h 左右达到最大值。对照图 5-A 和图 5-B 发现, 荧光强度与菌体浓度密切相关。为此我们用荧光强度对菌体浓度的比值表示表达强度,结果如图 6 所示,从曲线总体趋势来看含有表达载体 pABN165P_{EF}-gfp 的 *Bacillus* sp. N16-5 与含有表达载体 pABN165P43-gfp 的 *Bacillus* sp. N16-5 表达活性在 7.5 - 12 h 基本是不断提高的。在 13 h, 菌体生长进入衰亡期时,含有表达载体 pABN165P43-gfp 的 *Bacillus* sp. N16-5 表达活性明显降低,但含有表达载体在 pABN165P_{EF}-gfp 的 *Bacillus* sp. N16-5 的表达活性仍然有所提高。9 - 12 h 含有表达载体 pABN165P43-gfp 的 *Bacillus* sp. N16-5 的表达活性比含有表达载体 pABN165P_{EF}-gfp 的 *Bacillus* sp. N16-5 的表达活性要高一些。这种现象可能与菌体的生长状态,启动子不同时间段的转录活性有关。

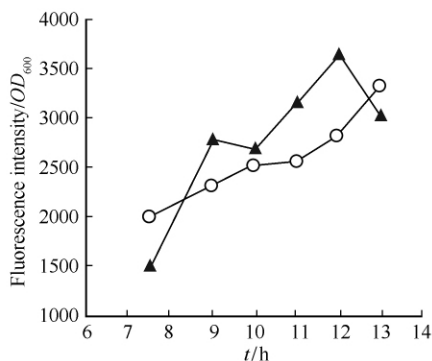


图 6. 表达活性随时间的变化

Figure 6. Expression activity change over time. Circle ○: *Bacillus* sp. N16-5 carrying expression vector pABN165P_{EF}-gfp, Triangle △: *Bacillus* sp. N16-5 carrying expression vector pABN165P43-gfp.

3 结论

针对嗜碱芽孢杆菌杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 缺少表达载体的现状,本研究从改造启动子和核糖体结合位点角度探索了嗜碱芽孢杆菌杆菌 N16-5 表达载体的构建。在启动子的选择上,一是从遗传进化角度考虑,选择了同属的枯草芽孢杆菌的组成型强启动子 P43,二是参考 N16-5 菌转录组数据和基因组序列,根据转录水平和基因结构,直接对 *Bacillus* sp.

N16-5 的启动子进行筛选,该种筛选方法与传统文库构建筛选相比,工作量小,步骤简单,并且更具有目的性和针对性。在核糖体结合位点的选择上,通过分析 N16-5 菌基因组序列特征,用 AAGGAGGA 替换了 pHCMC04 原先的核糖体结合位点 AAAGGGGAAA,其中 AAGGAGGA 中带有芽孢杆菌最典型的 SD 序列 GGAGG^[16]。质粒则选择了带有 Theta 型复制子遗传稳定的 pHCMC04。这些因素使我们将不能在 N16-5 菌表达 GFP 的载体 pHCMC04 成功地改造为 N16-5 菌的表达载体,并首次实现了外源基因 *gfp* 在 N16-5 菌中的表达。*Bacillus* sp. N16-5 表达载体的成功构建为我们对目标菌株进行生理机制研究和代谢遗传工程改造提供了基础平台。

从荧光定性检测和定量数据分析来看,该表达系统的效率还需要进一步提高。下一步我们将对表达系统的强度及其影响因素进行深入探讨,并对其进行优化,实现目的基因在 *Bacillus* sp. N16-5 中的高效表达。

参考文献

- [1] Horikoshi K. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63 (4) : 735-750.
- [2] Fujinami S, Fujisawa M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes - past, present and future. *Environmental Technology*, 2010, 31 (8) : 845-856.
- [3] Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Review Microbiology*, 2011, 9 (5) : 330-343.
- [4] Martinez MA, Delgado OD, Baigori MD, Siñeriz F. Sequence analysis, cloning and over-expression of an endoxylanase from the alkaliphilic *Bacillus halodurans*. *Biotechnology Letters*, 2005, 27 (8) : 545-550.
- [5] Redecke L, Brehm MA, Bredehorst R. Cloning and characterization of dihydrofolate reductase from a facultative alkaliphilic and halotolerant *Bacillus* strain. *Extremophiles*, 2007, 11 (1) : 75-83.
- [6] Ito M, Nagane M. Improvement of the electro-

- transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65 (12) : 2773-2775.
- [7] Wallace JG, Breaker RR. Improved genetic transformation methods for the model alkaliphile *Bacillus halodurans* C-125. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52 (4) : 430-432.
- [8] Li G, Rao L, Xue YF, Zhou C, Zhang Y, Ma YH. Cloning, Expression, and Characterization of a Highly Active Alkaline Pectate Lyase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20 (4) : 670-677.
- [9] Ma YH, Xue YF, Dou YT, Xu ZH, Tao WY, Zhou PJ. Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 2004, 8 (6) : 447-454.
- [10] Li G, Song YJ, Xue YF, Rao L, Zhou C, Wang QH, Ma YH. Comparative proteome analysis of alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 grown on different carbon sources. *Science China Life Sciences*, 2011, 54 (1) : 90-100.
- [11] Gao C, Xue Y, Ma Y. Protoplast transformation of recalcitrant alkaliphilic *Bacillus* sp. with methylated plasmid DNA and a developed hard agar regeneration medium. *PLoS One*, 2011, 6 (11) : e28148.
- [12] Nguyen HD, Nguyen QA, Ferreira RC, Ferreira LC, Tran LT, Schumann W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, 2005, 54 (3) : 241-248.
- [13] Titok M, Suski C, Dalmais B, Ehrlich SD, Jannièrè L. The replicative polymerases PolC and DnaE are required for theta replication of the *Bacillus subtilis* plasmid pBS72. *Microbiology*, 2006, 152 (Pt 5) : 1471-1478.
- [14] Wang PZ, Doi RH. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* sigma 55 and sigma 37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259 (13) : 8619-8625.
- [15] Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera BA. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by Use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (6) : 1951-1957.
- [16] Louise B and Dennis JH. *Bacillus subtilis* requires a "Stringent" Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA*, 1984, 3 (1) : 17-21.

Construction of expression vectors for alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5

Wenxia Liu^{1,2}, Jinshan Li¹, Chenghua Gao, Yanfen Xue^{1*}, Yanhe Ma¹

¹State Key Laboratory of Microbial Sources and National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] To construct an expression vector for alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. [Methods] *Bacillus subtilis*

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2013CB733900) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA02A206)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807616; E-mail: xueyf@im.ac.cn

Received: 5 May 2013 / Revised: 19 June 2013

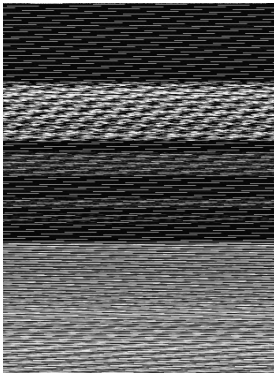
expression vector pHCMC04 was used as a backbone. Its xylose-inducible promoter cassette was replaced by the constitutive promoters P43 (from *B. subtilis*) and P_{EF} (from *Bacillus* sp. N165), separately, resulting in two expression vectors pABN165P43 and pABN165P_{EF}. Green fluorescent protein gene *gfp* was linked to the two vectors as a reporter gene. Fluorescence microscope and multifunctional fluorescent reader were used to test the expression efficiency of the system. **[Results]** Green fluorescence was visualized in *Bacillus* sp. N16-5 with pABN165P_{EF}-*gfp* or pABN165P43-*gfp*. Quantitative data analysis revealed that fluorescence was first detected around the 7th hour. The fluorescence intensity increased rapidly from the 7th hour to the 12th hour and reached the maximum at about the 12th hour. **[Conclusion]** Two expression vectors for *Bacillus* sp. N16-5 have been constructed, allowing expression of exogenous protein in alkaliphilic *Bacillus* sp. N165.

Keywords: *Bacillus* sp. N16-5, expression vector, alkaliphilic

(本文责编:张晓丽)

化工出版社新书推介(2013年12月)

现代生物技术(中译本)



作者:(荷兰) Johannes Tramper & Yang Zhu

翻译:于洁,李寅,朱阳

ISBN:978-7-122-17499-4;定价:49元;开本:16;装帧:平装;页码:248

内容简介:现代生物技术在解决人类社会面临的人口、健康、资源和环境等重大问题上表现出了巨大的应用潜力。然而,与历史上任何新兴技术面世的时候一样,广大民众对现代生物技术这样一种新兴高技术的内涵并不清楚,因此容易产生怀疑、误解,甚至恐惧,阻碍了现代生物技术的正常发展和应用。

为了更好地认识现代生物技术的科技内涵,本书以现代生物技术在食品和医疗领域的发展和应为主线,希望以事实为依据,为读者提供一个丰富且可靠的信息来源,从而消除偏见,正确判断现代生物技术对人类带来的福音还是灾难。

本书共分四部分。第一部分是引言,重点介绍了现代生物技术的两面性。第二部分“日常饮食”,分别从奶酪、烘烤食品、葡萄酒、生物技术肉制品和所谓“妖魔食品”等入手,阐述生物技术和各种日常饮食之间的渊源。第三部分“健康也有极限”,则从抗生素、荷尔蒙、基因治疗、异种器官移植、人类基因组计划和干细胞治疗等六个与健康与医学相关的方面,分析现代生物技术与人类的密切关系。最后一部分是“尾声”,希望给读者留下一个印象和认识:“生物技术不一定是有害的!”

本书主要选材于日常生活中与现代生物技术密切相关的实例,所参考的文献多来自《自然》、《科学》等国际知名期刊或杂志,将专业的理解和大众的视角结合起来,向人们介绍现代生物技术的基本原理及其利弊;语言通俗易懂,大量使用简明易懂的插图和插页,深入浅出地解释生物技术的热门话题。

本书适合于具有中等文化以上的读者阅读。

订购方式:网上购书

化工出版社: <http://shop.cip.com.cn/product/20131001/283979787122174994.html>