



基因串联策略强化枯草芽孢杆菌终止子的功能及其在基因表达中的应用

林巧¹, 周哲敏^{1,2}, 崔文璟^{1,2*}

¹江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

²江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 在底盘微生物中使用高性能终止子能够显著增强基因终止效率, 维持新合成 mRNA 的稳定性, 提升外源基因表达性能。而目前缺乏专一用于枯草芽孢杆菌的终止子元件, 限制了复杂功能基因电路的设计。【目的】在枯草芽孢杆菌中挖掘新的高性能终止子, 并进一步重新设计, 丰富适用于这一底盘的高性能人工终止子。【方法】将枯草芽孢杆菌终止子和枯草芽孢杆菌噬菌体终止子分别构建至终止子检测质粒中, 测定各终止子的终止效率(terminator efficiency, TE)。将不同强度单终止子按强弱、强强、弱弱组合构建串联终止子, 测定不同组合体的终止性能。利用高性能串联终止子进行天冬氨酸氨基裂解酶(AspA)和 β -葡萄糖苷酸酶(GusA)的表达功能验证, 检测高性能终止子对基因表达水平的作用。【结果】经过检测, TB5 终止子终止效率最强, TE 为 98%。含有 TB5 终止子的表达体系中 GFP 水平比对照上调 2.2 倍, RFP 的表达水平下调 27 倍。双串联组合体终止子中, TH1.5b-TB5 (TE=97%)和 TB5-TB5 (TE=98%)串联终止子可将 RFP 的表达水平下调 30 倍。而三串联终止子中, TB2-TB5-TB5 组合体与相应的双组合体相比, GFP 的表达水平虽无进一步提升, 但 RFP 的表达仅有参照的 1/300。最后, 通过 AspA 和 GusA 的重组表达确证了串联终止子 TH1.5b-TB5 和 TB10-TB5 对基因表达水平的提升作用。【结论】高终止效率的终止子可以显著提升上游基因的表达水平, 通过一定规律的基因串联能够进一步提升终止子的工作效率。这种人工再设计的终止子可方便、快捷地构建至细菌基因表达系统, 实现基因表达的高效调控。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 转录终止子, 串联终止子, 基因表达

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是典型的革兰氏阳性模式菌株, 由于其具有极强的分泌能力和温和的生长条件, 已被作为重要的底盘微生物, 广泛

用于 N-乙酰基葡萄糖胺^[1]、Leech hyaluronidase (LHAase)^[2]、poly- γ -glutamic acid^[3]等重要工业酶和高值平台化合物的生物合成中。这一应用需要

基金项目: 国家自然科学基金(21878125); 国家重点研发计划(2017YFE0129600)

*通信作者。Tel: +86-510-85197551; E-mail: wjcui@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-10-23; 修回日期: 2021-01-07; 网络出版日期: 2021-03-25

在底盘中构建各种各样复杂的基因线路来执行生物合成的功能。目前在构建基因线路时普遍使用的生物部件有各种类型的启动子^[4]、5'非翻译区调控序列^[5]、核糖体结合位点(RBS)^[6]、核糖开关和小 RNA^[7]、终止子和抗终止子^[8]等。在大肠杆菌中,这些生物元件发展得最为充分,并且经过了长期验证和调试,已经能够实现按需所取,即插即用^[9]。而在枯草芽孢杆菌中研究最多的是引导转录起始的启动子元件。长期以来的研究已发展出组成型、诱导型、自诱导型等种类丰富的元件,如 P43、Pveg 组成型启动子, PxylA 木糖诱导型启动子,以及 PsrfA 自诱导型启动子等^[10-12]。另外,在翻译水平上的调节可以通过设计新型核糖开关^[13],以及优化 RBS 序列来实现^[14]。然而,与大肠杆菌相比,虽然在基因表达元件设计和开发方面有一定进展,但其他类型的调控元件种类匮乏,并且标准化程度不高,急需扩大基因调控元件库,突破在这一底盘细胞中设计复杂基因线路的瓶颈^[15]。

终止子作为转录终止不可缺少的元件,可以防止错误表达反义转录产物干扰正常基因表达、提供 3'末端调节转录的结构、提高 RNAP 利用率,同时还可提高 mRNA 的稳定性,增强上游基因的表达等^[16]。因此,越来越多的研究表明,终止子在设计的基因线路中对调节各模块基因表达起着重要的作用。细菌中的天然的转录终止可分为两种:Rho 因子依赖型和非 Rho 因子依赖型(也称为固有终止子)。此外,根据是否在两个转录方向上具有终止作用又可分为单向终止子和双向终止子。在原核生物中^[17],Rho 因子依赖的终止子一般需要 Rho 蛋白和 ATP 来进行辅助,才可使 RNA 聚合酶从新生模板链上掉落;原核生物体内大多含固有终止子,并且许多固有终止子并不是直接位于终止密码子之后,且终止子长度一般小于 50 bp。固有终止子的结构特点是:富含 GC 的茎环和位于 3'端的 U-tract。在转录时,内在终止子依靠特殊的回文序列形成发卡结构,在终止子 3'端的 poly-U 处形

成 7-9 nt 的 DNA:RNA 杂合物,使转录聚合物解聚、RNA 聚合酶掉落进而停止转录^[8]。

天然终止子在转化到合成生物技术实际设计过程中,需要根据基因线路的调控需求来选择合适的终止子。Chen 等和 Du 等^[18-19]研究发现,不同强度的启动子需要匹配不同强度的终止子,为了避免对下游基因转录造成影响,强启动子需要强终止子进行转录终止。在体内需要使用转录终止子隔绝不同转录单元之间的干扰,但大量重复终止子的使用致使 DNA 序列间发生重组,进而导致遗传不稳定,影响异源基因表达。为了解决这一问题,MacPherso 等^[20]使用随机序列构建具有不同序列的人工终止子,以避免重复序列,同时这些人工从头设计的序列具有不同终止效率。这种设计策略由于需要构建容量超大的基因文库,并需要大量的筛选,对高通量筛选技术有严格的需求,并且需要大量且烦琐的重复性工作。而结果往往是筛选过程中绝大多数的序列都是无效序列。这一问题促使研究者采用另外一种更加理性的设计方法,根据已有的天然序列信息,借助再设计的手段来获取功效更强的终止子元件。

基于此,本文挑选了 10 个具有不同 ΔG 的 *B. subtilis* 来源的终止子和 5 个噬菌体来源的终止子在 *B. subtilis* 168 菌株中进行终止效率的测定,得到了不同终止效率的终止子。然后将不同终止子进行不同拷贝数的串联,发现弱-弱、弱-强终止子的串联可以进一步提高上游基因的表达量和抑制下游基因的表达,三串联终止子几乎完全抑制下游基因的表达。将高终止效率的串联终止子用于外源重组蛋白的表达,可提高外源蛋白的表达量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:本研究所用菌株和质粒见表 1。

表 1. 本研究所用的菌株和质粒
Table 1. Plasmids and strains used in this study

Plasmids and Strains	Description	Sources
Stains		
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi⁻¹, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacIq, lacZΔM15]</i>	Lab stock
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Lab stock
Plasmids		
pMA09	<i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle vector, with promoter P _{HpaII} , Amp ^R in <i>Escherichia coli</i> , Kan ^R in <i>Bacillus subtilis</i>	Lab stock
pBP43GFP	pMA09 with P43 promoter and <i>gfp</i>	Lab stock
pBP43GFP-mCherry(GM)	pBP43GFP with mCherry	This study
pBP43GFP-TB1-mCherry	GM with TB1	This study
pBP43GFP-TB2-mCherry	GM with TB2	This study
pBP43GFP-TB3-mCherry	GM with TB3	This study
pBP43GFP-TB4-mCherry	GM with TB4	This study
pBP43GFP-TB5-mCherry	GM with TB5	This study
pBP43GFP-TB6-mCherry	GM with TB6	This study
pBP43GFP-TB7-mCherry	GM with TB7	This study
pBP43GFP-TB8-mCherry	GM with TB8	This study
pBP43GFP-TB9-mCherry	GM with TB9	This study
pBP43GFP-TB10-mCherry	GM with TB10	This study
pBP43GFP-TH1-mCherry	GM with TH1	This study
pBP43GFP-TH1.5a-mCherry	GM with TH1.5a	This study
pBP43GFP-TH1.5b-mCherry	GM with TH1.5b	This study
pBP43GFP-TH2-mCherry	GM with TH2	This study
pBP43GFP-TH3-mCherry	GM with TH3	This study
pBP43GFP-TH1.5b-TB10-mCherry	GM with TH1.5b-TB10	This study
pBP43GFP-TH1.5a-TB10-mCherry	GM with TH1.5a-TB10	This study
pBP43GFP-TB2-TB10-mCherry	GM with TB2-TB10	This study
pBP43GFP-TB5-TB10-mCherry	GM with TB5-TB10	This study
pBP43GFP-TB6-TB10-mCherry	GM with TB6-TB10	This study
pBP43GFP-TB7-TB10-mCherry	GM with TB7-TB10	This study
pBP43GFP-TB10-TB10-mCherry	GM with TB10-TB10	This study
pBP43GFP-TH1.5b-TB5-mCherry	GM with TH1.5b-TB5	This study
pBP43GFP-TH1.5a-TB5-mCherry	GM with TH1.5a-TB5	This study
pBP43GFP-TB2-TB5-mCherry	GM with TB2-TB5	This study
pBP43GFP-TB5-TB5-mCherry	GM with TB5-TB5	This study
pBP43GFP-TB6-TB5-mCherry	GM with TB6-TB5	This study
pBP43GFP-TB7-TB5-mCherry	GM with TB7-TB5	This study
pBP43GFP-TB10-TB5-mCherry	GM with TB10-TB5	This study
pBP43GFP-TB2-TH1.5b-TB5-mCherry	GM with TB2-TH1.5b-TB5	This study
pBP43GFP-TB2-TB5-TB5-mCherry	GM with TB2-TB5-TB5	This study
pBP43GFP-TB5-TH1.5b-TB1-mCherry	GM with TB5-TH1.5b-TB1	This study
pBP43GFP-TB5-TB5-TB10-mCherry	GM with TB5-TB5-TB10	This study
pBP43GFP-TB6-TB5-TB10-mCherry	GM with TB6-TB5-TB10	This study
pBP43GFP-TB6-TH1.5b-TB10-mCherry	GM with TB6-TH1.5b-TB10	This study
pBglpD-GusA	pMA09 with <i>gfpD</i> element and GusA	Lab stock
pBP43-EcAspA	pMA09 with P43 promoter, AspA and riboswitch	Lab stock
pBP43-AspA-0	pMA09 with P43 promoter and AspA	This study
pBP43-AspA-TH1.5b-TB5	pBP43-AspA with TH1.5b-TB5	This study
pBP43-AspA-TB10-TB5	pBP43AspA with TB10-TB5	This study
pBP43-GusA-0	pMA09 with P43 promoter and <i>gusA</i>	This study
pBP43-GusA-TH1.5b-TB5	pBP43- <i>gusA</i> with TH1.5b-TB5	This study
pBP43-GusA-TB10-TB5	pBP43- <i>gusA</i> with TB10-TB5	This study

1.1.2 主要试剂和仪器: PrimeTHAR[®] Max DNA 聚合酶、*Dpn* I DNA 消化酶, DNA marker 购自 TaKaRa (北京)公司; 2×GenRec 重组试剂盒购自通用生物系统(安徽)有限公司; *Bam*H I、*Sac* II、*Xho* I、*Sac* I 限制性内切酶和 T4 DNA ligase 购于 New England Biology 公司; 质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; PCR 仪、蛋白电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 分光光度计购自上海美谱达仪器有限公司; 多功能酶标仪购自 BioTeck 公司。

1.2 终止子测定平台的构建

本实验对编码红色荧光蛋白 mCherry 的基因进行密码子优化, 并使用 RBS calculator 在线设计网站(<https://salislab.net/software/>)为其匹配合适的 RBS。用引物 mCherry-1/mCherry-2 扩增 *mCherry* 基因; 以 P1/P2 为引物, pBP43GFP 为模板扩增质粒骨架。PCR 扩增产物用 *Dpn* I DNA 消化酶消化 2 h, 再对 PCR 产物进行纯化, 最后使用 Gibson assembly 将 *mcherry* 线性片段和 pBP43GFP 骨架片段融合、环化, 然后转化 *E. coli* JM109 并挑取单菌落进行测序验证, 重组质粒 pBP43-GFP-

mCherry (GM)保存至-20 °C 备用。

单终止子检测平台构建。单终止子检测质粒基因结构如图 1 所示。终止子单链寡核糖酸由金唯智生物科技有限公司合成, 末端包含 *Bam*H I 和 *Sac* II 酶切后粘末端的序列, 如表 2。将其按体积比为 1:1 的量加入 PCR 管中, 以温度梯度退火的方式连接终止子, 程序设置如下: 98 °C 1 min; 95 °C 30 s, 接下来从 90 °C 开始, 每隔 30 s, 温度依次降低 2 °C, 直至 40 °C, 然后 4 °C 保温。

用 *Bam*H I 和 *Sac* II 酶切质粒 GM, 纯化后使用 T4 DNA ligase 连接终止子和线性化 GM 载体骨架, 16 °C 过夜连接。连接产物转化 *E. coli* JM109, LB 琼脂平板过夜培养后挑取单菌落, LB 液体培养后提取质粒, DNA 测序验证。然后使用 Spizizen 法转化枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168^[21], 构建出含有单终止子检测功能的重组菌。

双串联终止子平台的构建。检测质粒中基因结构如图 2 所示。将 *gfp* 基因下游顺序串联的 2 个终止子所在位置定义为 A 和 B。设定 B 位终止子为 TB5 或 TB10, A 位使用前述选择的不同单终止子 (TH1.5a, TH1.5b, TB2, TB5, TB6, TB7, TB10) 与 B 位串联。合成末端含有 *Bam*H I 和 *Sac* II 酶切

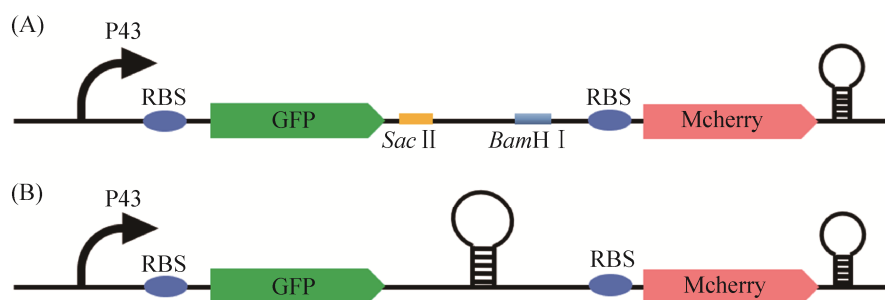


图 1. 终止效率测定平台的构建

Figure 1. Construction of measurement platform of terminators. A: schematic diagram of control plasmid GM; B: schematic diagram of construction of single terminator.

表 2. 本研究所用引物
Table 2. Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'→3')
mCherry-1	TCCGCGGGATTACGGATCCT
mCherry-2	ATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTT
P1	GCTCTCCTGAGTAGGACAAATTCTGTGCGGTATTTACACC
P2	ACAGGATCCGTAATCCCAGCGATTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
TB1-1	CAAACAGCGGGAGGATACAGCCAATTCTTTTTTTTATGCTATAA
TB1-2	GATCTTATAGCATAAAAAAAGAATTGGCTGTATCCTCCCCTGTTTGGC
TB2-1	GAAAGGACTGCATAGCCAGTCTTTTCTTTTATTTTA
TB2-2	GATCTAAAATAAAAGAAAAGACTGGCTATGCAGTCTTTTCGC
TB3-1	TAATAGAATGGTATTTAAATGAGAATGCTATCAATTTTTTTGTAGTCAGC
TB3-2	GATCGCTGACTACAAAAAATGATAGCATCTCATTTAAATACCATTCTATTAGC
TB4-1	AGAAACCGGTCTGGCTGCCAGCCGGTTCTTTTTTTTATTC
TB4-2	GATCGAATAAAAAAGAAACCGGCTGGCAGCCAGACCGGTTTCTGC
TB5-1	CAGGACACCGTTCAAATTGAACGGTGTTTTTCTTTGAAAAG
TB5-2	GATCCTTTTCAAAGAAAAACACCGTTCAATTTGAACGGTGTCTGGC
TB6-1	ACAAACTGCCGGTCTACGGTACGGGTTCTTTTTTCATTATTGGA
TB6-2	GATCTCCAATAATGAAAAAGAACCCGTACCGTAGGACCGGGCAGTTTGTGC
TB7-1	CAGGAGCGGTTCAAATTGAACGCACCTTTTTCTTTGAAAAG
TB7-2	GATCCTTTTCAAAGAAAAAGTGCCTTCAATTTGAACGCGCTCCTGGC
TB8-1	AGCAAGGACTGCTGAAAGGGCTGACATAAGCCTTTTGCCGCGGGTCTTTTTTAATTCTGAT
TB8-2	GATCATCAGAAATTAATAAAGGACCGCCGCAAAAGGCTTATGTCAGCCCTTTCAGCAGTCTTGTCTGC
TB9-1	CTCAATCCCTTGGCACTAAAAGTGCAGGGGATTTTTTATGTTAATA
TB9-2	GATCTATTAACATAAAAAATCCCCTGACACTTTTAGTGCCAAGGGATTGAGGC
TB10-1	CAAAAGAGGAGTTAGTGCCTCTGCTCAGGCACTACTCCTCTTTTTGGGATTTTCT
TB10-2	GATCAGAAAATCCCAAAAAGAGGAGTAGTGCCTGAGCAGAGGCACTAACTCCTCTTTTGGC
TH1-1	CCCTCCTGTACTAGGAGGGTATTTTTTT
TH1-2	GATCAAAAAAATACCCTCCTAGTACAGGAGGGGC
TH1.5a-1	GGGAGCCTCAAGGCTCCCTTTAGTTT
TH1.5a-2	GATCAAATAAAGGAGCCTTGAGGCTCCCGC
TH1.5b-1	GAGTAGGCTACACCTACTCTTTGT
TH1.5b-2	GATCACAAGAGTAGGTGTAGCCTACTCGC
TH2-1	GGGCGGGTCTTCCC GCCCTACTTTTT
TH2-2	GATCAAAAAAGTAGGGCGGAAGACCCGCCCGC
TH3-1	TGCCCTGAATGGCTTAGTTGCTGTTCAAGGGCATTTTTT
TH3-2	GATCAAAAATGCCCTGAACAGCAACTAAGCCATTCAAGGGCAGC
A-TB5-1	CTCGAGGAGTCCGAGCTCCAGGACACCGTTCAAATTGAACGGTGTTTTTCTTTGAAAAG
A-TB5-2	CTTTTCAAAGAAAAACACCGTTCAATTTGAACGGTGTCTGGAGCTCGGACTCCTCGAGGC
A-TB10-1	CTCGAGGAGTCCGAGCTCCAAAAGAGGAGTTAGTGCCTCTGCTCAGGCACTACTCCTCTTTTTGGGA TTTTCT
A-TB10-2	AGAAAATCCCAAAAAGAGGAGTAGTGCCTGAGCAGAGGCACTAACTCCTCTTTTGGAGCTCGGACT CCTCGAGGC
3cascadeTH1.5b-1	TCGAGAGTAGGCTACACCTACTCTTTGTAGCT
3cascadeTH1.5b-2	ACAAAGAGTAGGTGTAGCCTACTC
3cascadeTB5-2	TCGACAGGACACCGTTCAAATTGAACGGTGTTTTTCTTTGAAAAGAGCT
3cascadeTB5-2	CTTTTCAAAGAAAAACACCGTTCAATTTGAACGGTGTCTG
GusA-i-F	AGGAATGTACACATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA
GusA-i-R	TCAGGCGAATTCTCACCGCCGCATAGGCCTTGTTG
GusA-V-F	ATGCGGCCGGTGAGAATTCGCCTGATGCGGTATTTT
GusA-V-R	AGGACGTAACATGTGTACATTCCTCTTTACCTATAA
AspA-i-F	GAGAGGAATGTACACATGTCAAACAACATTCGATCGAAG
AspA-i-R	GGCGAATTCTTACTGTTTCGCTTTTATCAGTATAGC
AspA-v-F	GAAAGCGAACAGTAAGAATTCGCCTGATGCGGTATTTT
AspA-v-R	TTTGACATGTGTACATTCCTCTTTACCTATAATGG
TB10-TB5-F	GGGATTTTCTCTCGAGGAGTCCGAGCTCCAGGACACCGTTCAAATTGAACGGTGTTTTTCTTTGAAA AGTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTT
TB10-TB5-R	CGGACTCCTCGAGAGAAAATCCCAAAAAGAGGAGTAGTGCCTGAGCAGAGGCACTAACTCCTCTTT TGGAAAATACCGCATCAGGCGAATTC
TH1.5b-TB5-F	AGGAGTCCGAGCTCCAGGACACCGTTCAAATTGAACGGTGTTTTTCTTTGAAAAGTCTTACGCATC TGTGCGGTATTTT
TH1.5b-TB5-R	CGGTGTCTCGGAGCTCGGACTCCTCGAGACAAAAGAGTAGGTGTAGCCTACTCGAAAATACCGCATCA GGCGAATTC

后粘末端序列的双终止子寡核苷酸，两元件之间的间隔区加入 *Xho* I 和 *Sac* I 酶切位点，如表 2 中的 A-TB5-1/2 和 A-TB10-1/2。双终止子两条单链寡核苷酸退火同前述程序。退火后与用 *Bam*H I 和 *Sac* II 限制性内切酶对质粒 GM 酶切连接，方法同前述单终止子构建。

三串联终止子检测平台的构建，基因结构如图 3 所示。合成末端包含 *Xho* I 和 *Sac* I 酶切后粘末端序列的终止子寡核苷酸序列，见表 2。退火后与 *Xho* I 和 *Sac* I 酶切后的双终止子重组质粒连接，其余步骤同单终止子构建方式。

1.3 终止效率的测定

本研究使用终止效率 (termination efficiency, TE) 表征终止子元件的转录终止效能^[22]。将完全破坏转录复合物的终止子的 TE 值定义为 100%；将两个报告基因之间无终止子时的转录通读定义为 1。采用下游 mCherry(FI_{Dw}) 与上游 GFP(FI_{Up}) 的荧光比值来估计终止子通读率 (termination rate, TR)，即 $TR = FI_{Dw} / FI_{Up}$ 。当上下游报告基因之间无终止子，以此为参考通

读值(TR_{REF})，然后将所有 TR 测量值标准化： $TR_{NORM} = TR / TR_{REF}$ ，用以下方程计算终止效率， $TE = 100 \times (1 - TR_{NORM})$ 。

含不同类型终止子的 *B. subtilis* 168 重组在 LB 平板上划线，于 37 °C 过夜培养。挑取单菌落于含有卡那霉素的 5 mL 试管中，培养 12 h。测定样品的 OD_{600} ，按照初始接种量($OD_{600} = 0.05$)接种到含有 50 mL LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中，37 °C、200 r/min 培养 24 h，之后吸取 1 mL 菌液，12000 r/min 离心 2 min，收集菌体，PBS 缓冲液洗涤 3 次，再用等体积 PBS 重悬菌体，取 200 μ L 至 96 孔板，检测 OD_{600} 和荧光强度。参数设置：吸收光 600 nm，检测菌体浓度；激发光 495 nm，发射光 525 nm，增益 60，检测 GFP 荧光强度；激发光 587 nm，发射光 610 nm，增益 80，检测 mCherry 荧光强度。

1.4 天冬氨酸氨基裂解酶和 β -葡萄糖苷酸酶重组蛋白表达质粒的构建

以 pBglpD-gusA 为模板，使用引物 gusA-i-F/R 扩增 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GusA)基



图 2. 双串联终止子构建示意图

Figure 2. Schematic diagram of the construction of double series terminators.

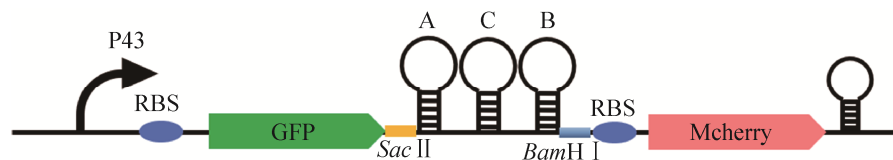


图 3. 三串联终止子构建示意图

Figure 3. Schematic diagram of construction of three series terminators.

因, 以 pBP43GFP 为模板, 使用引物 gusA-v-F/R 扩增 GusA 骨架; 以 pBP43EcAspA 为模板, 使用引物 AspA-i-F/R 扩增大肠杆菌天冬氨酸氨基裂解酶(L-aspartate amino lyase, AspA)基因, 使用引物 AspA-i-F/R 扩增 AspA 骨架。PCR 扩增产物用 *Dpn* I DNA 消化酶消化 2 h, 再将 PCR 产物纯化, 然后将对应的骨架与片段进行 Gibson 组装, 最后转化 *E. coli* JM109 并挑取单菌落进行测序验证。构建成功的各重组质粒转化 *B. subtilis* 168 后, 构建出重组菌, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。不含终止子的质粒 pBP43-gusA-0、pBP43-AspA-0 转化 *B. subtilis*168 后作为对照组。将串联终止子用于重组蛋白表达的质粒构建: 以 pBP43-gusA-0、pBP43-AspA-0 为模板, 以 TB10-TB5-F/R 和 TH1.5b-TB5-F/R 为引物进行反向 PCR 扩增, 构建出质粒 P43-AspA-TH1.5b-TB5、P43-AspA-TB10-TB5、P43-gusA-TH1.5b-TB5、P43-gusA-TB10-TB5, 最后把重组质粒转化 *B. subtilis* 168 并保存。

1.5 SDS-PAGE 检测

取出保藏的甘油菌划线至 LB 固体平板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后, 挑取单菌落至试管, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 8–10 h。按照初始细胞密度 $OD_{600}=0.05$ 接种到含 50 mL LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h。将培养基中的培养液取出 1 mL, 12000 r/min 离心 2 min, 收集菌体, 用 $1\times$ PBS 缓冲液清洗 3 次, 再加入含有 1 mg/mL 溶菌酶的 TE 缓冲液悬浮, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴 2 h。超声破碎, 工作时长 3 s, 间歇时间 2 s, 直至菌悬液澄清透明。12000 r/min 离心 20 min, 取 200 μL 上清, 然后加入 50 μL 的 $5\times$ loading buffer, 沸水浴 10 min, 上样检测。

2 结果和分析

2.1 *B. subtilis* 中单拷贝终止子的选择及转录终止功能的鉴定

本研究根据现有 *B. subtilis* 终止子组学数据的挖掘^[23], 对 425 个内源终止子的自由能 ΔG 值分布进行统计, 结果见图 4。 ΔG 值从 -31.9 kcal/mol 到 -2.5 kcal/mol 之间分布较宽泛, 本实验随机选取了 10 个具有不同 ΔG 的终止子, 为了与 *B. subtilis* 内源终止子比较, 同时又选取了 5 个 *B. subtilis* 噬菌体 SPO1 来源的终止子^[24]。

将以上终止子序列构建到终止子检测平台 GM 上, 转化 *B. subtilis* 168 后, 挑取单菌落至试管, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 8–10 h。按照初始 $OD_{600}=0.05$ 接种到 250 mL 锥形瓶中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h, 检测 GFP 和 mCherry 的荧光水平, 并计算终止效率(TE)。结果如图 5 所示, 相比于参照组, 插入不同终止子后, 终止子上游 GFP 的荧光强度有不同程度的提升(1.1–2.2 倍), 并下调下游 mCherry 荧光强度(1.3–28.4 倍), 表明插入的终止子发挥了

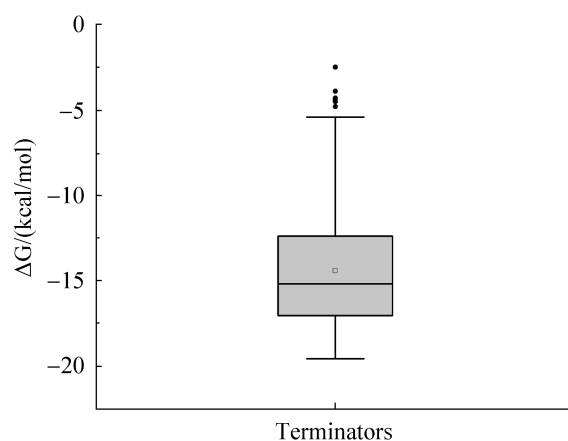


图 4. 枯草芽孢杆菌 425 个内源终止子的自由能
Figure 4. The ΔG of 425 terminators derived from *Bacillus subtilis*.

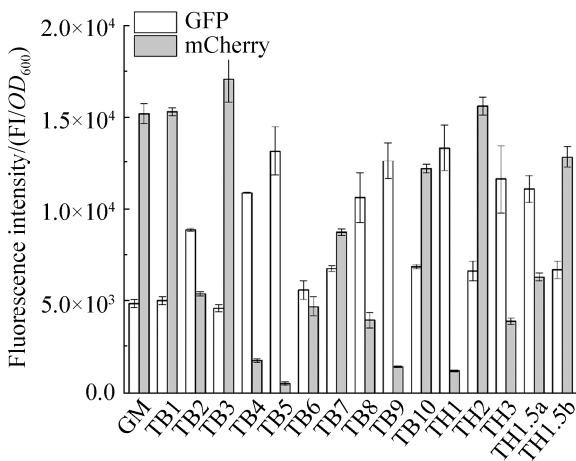


图 5. 单终止子的荧光强度

Figure 5. Fluorescence intensity of terminators.

转录终止功能, 对下游的 mCherry 转录产生了较强的抑制作用。其中, 与参照相比, TB5 终止子将上游 GFP 的表达水平(10896 ± 24.04)上调了 2.2 倍, 将下游 mCherry 表达(1784.04 ± 86.18)水平下调了 28.4 倍, 表现出较强的终止作用。

基于上述结果, 计算 15 种终止子的 TE 值, 并系统比较终止效率。结果如图 6 所示, TB4、TB5、TB9 和 TH1 为强终止子($TE > 95\%$), 其中 TB5

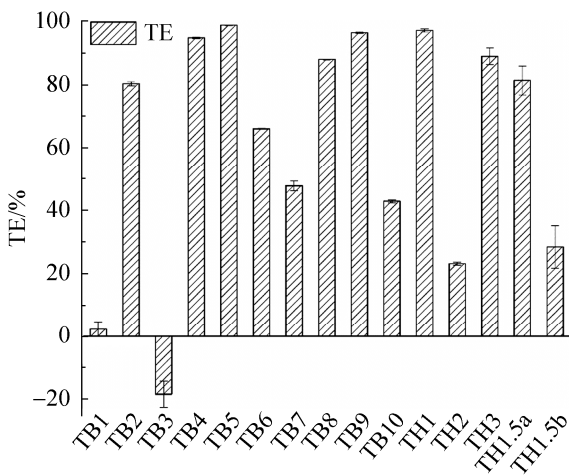


图 6. 单终止子终止效率的测定

Figure 6. Determination of the termination efficiency of single terminator.

终止效率为 99%; TB1、TB7、TB10、TH1 和 TH1.5b 为弱终止子($TE < 5\%$)。TB3 终止效率为负值, 表明这一元件不具有终止转录的作用, 推测为 RNA 元件。通过上述研究, 鉴定得到了终止效率较高的终止子。

2.2 双串联终止子对终止效率的影响及对基因表达水平的作用

已有研究表明, 转录调控元件间的重复或组合能够发挥更强的生物功能, 如人工复合启动子^[25]。在此, 为探究终止子间的组合对转录终止效率的影响和作用规律, 我们将 2 种终止子串联融合设计成双串联终止子, 如图 2 所示, 选取终止效率适中的 TB10 ($TE = 43\%$)和终止效率最高的 TB5 ($TE = 99\%$)作为双串联终止子中的 B 位终止子, 分别在其上游位置 A 位融合不同强度的终止子, 形成两组不同强度终止子的双串联组合, 构建到终止子检测质粒中测定双串联终止子的作用效率。结果如图 7 所示, TB10 终止子双串联组合中, TB10-TB10、TB7-TB10、TB6-TB10 串联体与 A 位单终止子相比, 上游 GFP 荧光强度有一定程度的上调, 且进一步下调了下游 mCherry 的荧光强度。当不同强度的终止子与 TB5 强终止子串联后, 上游 GFP 荧光强度与 A 位单终止子相比, 双串联终止子显著上调 GFP 的表达水平, 同时对下游 mCherry 具有显著下调效应。其中, 终止子串联体 TH1.5b-TB5 对 GFP 荧光水平的上调幅度最大(2.3 倍), TB5-TB5 串联体对 mCherry 表达水平的下调幅度最高(30.5 倍)。终止子串联之后, 与高终止效率的单终止子相比, 比如 TB5, 串联终止子对上游 GFP 的上调水平和下游 mCherry 的下调水平无显著影响, 推测这可能受限于启动子自身的转录水平。

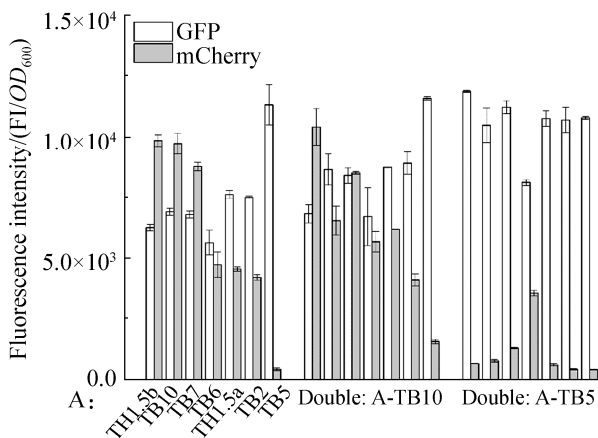


图 7. 双串联终止子上下游的荧光强度

Figure 7. Fluorescence intensity of dual tandem terminators.

最后, 通过计算得出双串联终止子的终止效率。结果如图 8, 与 A 位单终止子相比, TB10-TB10 和 TB7-TB10 的终止效率分别提高了 1.6 倍和 1.2 倍; TH1.5b-TB5、TB10-TB5、TB7-TB5 的终止效率分别提高了 2.7 倍、2.3 倍和 2 倍。这一结果说明, 弱终止子通过基因串联可以提高终止子的终止效率; 弱与强终止子串联, 可提升整体终止效

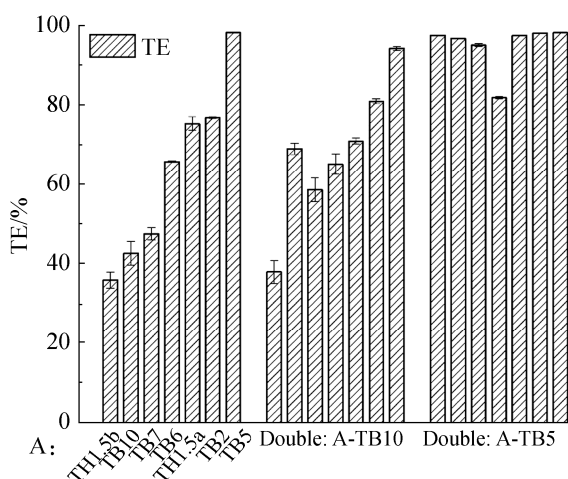


图 8. 双串联终止子的终止效率

Figure 8. Termination efficiency of dual tandem terminators.

率。结果中 TB5-TB5 的终止效率较 TB5 无显著提升主要原因是受限于目前终止子效率采用的检测方法。通过双荧光蛋白表达量的相对值来表示终止子强度难以在高转录终止效率区间分辨这种差异, 故在检测强-强串联的终止效率方面受到一定限制。

2.3 三拷贝串联终止子对终止效率的影响及对基因表达水平的作用

为了确证是否多个单终止子的串联能够持续提升终止效率, 本研究接下来构建了 3 个终止子融合的串联体, 分析增加终止子的串联融合数量影响终止效率的规律。选取终止效率相对较低的 TB6-TB10、TB6-TB5 和终止效率最高的 TB5-TB10、TB2-TB5 双串联终止子为模板, 分别与强终止子 TB5 和弱终止子 TH1.5b 进行再次串联, 构建具有不同组合的三串联终止子。将含有三串联组合终止子的重组菌在 250 mL 锥形瓶中培养 24 h 后, 检测 GFP 和 mCherry 的荧光强度。结果如图 9 所示, TB6-TB10 在与 TH1.5b 组合

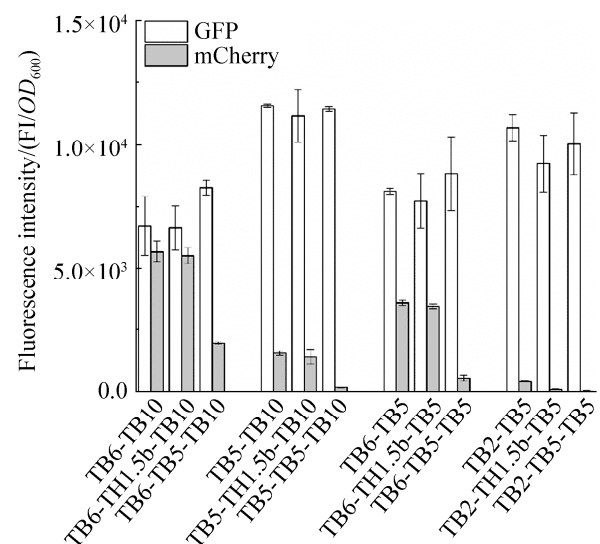


图 9. 三串联终止子上下游荧光强度

Figure 9. Fluorescence intensity of triple tandem terminators.

三串联后, GFP 和 mCherry 的荧光强度与相应的双串联终止子相比没有显著变化, 表明 3 个弱终止子串联后不能显著提升终止子的性能。TB5-TB10、TB6-TB5 和 TB2-TB5 双串联终止子在与 TB5 进一步组合后, 对 mCherry 产生了明显的抑制效应, 这一结果表明这种类型的串联组合方式可以对下游基因产生极高水平的转录抑制作用。

终止效率如图 10 所示, 与 TB5-TB10、TB2-TB5 串联的终止子, TE 值虽高于 90%, 但与双串联终止子相比, 没有显著提升, 提示 TE 大于 90% 的极强终止子再次提升效率的空间受限。低终止效率的双串联组合体 TB6-TB10、TB6-TB5 与强终止子 TB5 再次串联, 可提升终止效率 (TE>90%)。其中, TH1.5b 与不同双串联终止子进行串联时, 发现并不能提高 TE 值, 初步确定弱终止子进行三串联对提升终止效率有较大限制。

上述结果表明, 通过构建三串联的串联终止子, 在 *B. subtilis* 中对这些终止子进行表征, 获得

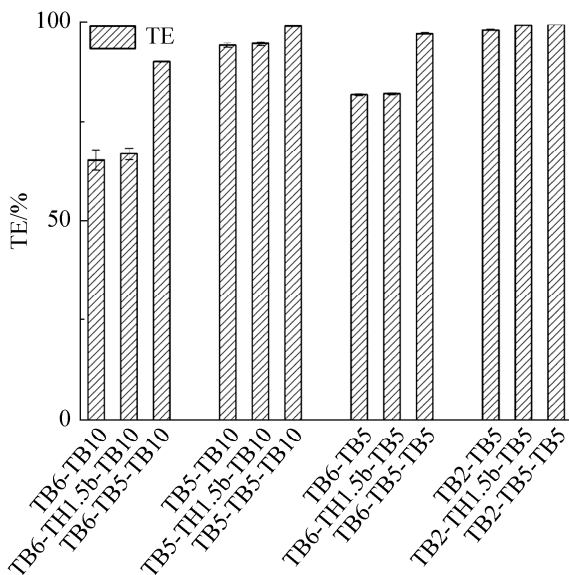


图 10. 三串联终止子的终止效率

Figure 10. Termination efficiency of triple tandem terminators.

了具有不同终止效率的新型终止子, 同时这些终止子对上游 GFP 的提高和下游 mCherry 的抑制都有明显区别。这些新型终止子丰富了枯草芽孢杆菌中的终止子库, 扩大了可供选择的范围。

2.4 强终止子在强化重组蛋白表达水平中的作用及功能验证

为检验串联终止子的可靠性和适用性, 将本研究构建的终止子用于不同类型的外源基因表达, 检验强化不同基因表达的效能。为了充分保证转录终止和稳定 mRNA, 强终止子选用高 TE 的双串联终止子 TH1.5b-TB5 和 TB10-TB5。外源基因选用大肠杆菌天冬氨酸氨基裂解酶(AspA)和 β -葡萄糖苷酸酶(GusA)两种酶进行终止子功能验证。构建出含 P43-AspA-0、P43-AspA-TH1.5b-TB5、P43-AspA-TB10-TB5、P43-GusA-0、P43-GusA-TH1.5b-TB5、P43-GusA-TB10-TB5 质粒的 *B. subtilis* 168 重组菌株。将保存的菌液划线得到单菌落, 转接 5 mL 试管, 然后转接 250 mL 锥形瓶培养 24 h, 收集菌液, 裂解细胞后进行 SDS-PAGE 分析。结果如图 11 所示, 与不含终止子的对照相

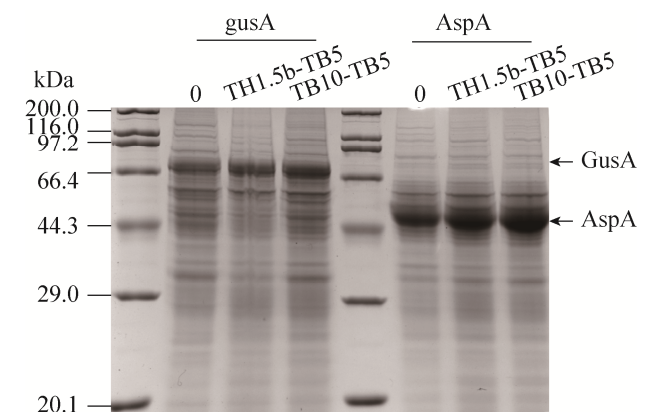


图 11. 串联终止子表达重组蛋白 GusA 和 AspA 的验证

Figure 11. Analysis of GusA and AspA expression.

比, 插入终止子后, AspA 和 GusA 蛋白的表达水平均有明显提升。同时发现, 同一终止子对于两种蛋白水平的提升幅度有差异。与 GusA 蛋白表达水平相比, 两种串联终止子对于 AspA 的表达水平提升更显著。相同终止效率的不同终止子对蛋白的表达有不同的影响, 终止子 TH1.5b-TB5 对于外源蛋白表达水平的提升略低于终止子 TB10-TB5。

3 讨论和结论

近些年来, 许多学者对终止子作了许多研究工作: 一方面是终止子的机理研究, 比如通过改变终止子两端序列来调节终止子终止效率^[26], 探究 RNA 聚合酶与转录终止的关系, 建模预测终止子的终止效率^[22]; 另一方面是将终止子应用于外源基因表达, 比如通过使用 3 个 T7 终止子串联的方式提高目的产物产量^[27], 添加终止子提高不同转录单元的稳定性^[28]。

本研究发现, 强终止子可以提高上游基因的表达水平。不同终止效率的终止子对上游基因表达水平的提升不同, 总体而言, 终止效率越高, 对上游基因表达水平的上调程度越显著, 表明强终止子可以通过稳定 mRNA、延长半衰期来提高上游基因的表达水平, 终止效率越高, 其稳定性越高。与这一结果类似, 在真核细胞中^[29], 也可以利用终止子延长 mRNA 半衰期和提升 mRNA 稳定性, 进而提升表达量。本研究所提出的策略能够从天然终止子中快速构建性能更强的终止子的新策略。当可用的天然终止子元件稀少, 性能不够强时, 可通过此策略快速提升天然终止子的作用性能。如文中 TH1.5b-TB5 和 TB10-TB5 终止效率为 97%, 终止效率较 TH1.5b 和 TB10 提高了 2.5 倍。而当串联终止子的数目达到 3 个时, 位于终

止子下游的基因基本不表达, 可完全抑制转录通读。

本研究显示枯草芽孢杆菌的内源终止子终止效率要高于这一菌种的噬菌体终止子。分析这部分高终止效率的终止子序列结构, 发现低吉布斯自由能且茎部无凸起的终止子具有较高的终止效率。目前使用的多为天然终止子, 序列中不仅含有终止功能序列, 同时还具有调控序列的功能^[30]。直接用于构建基因表达调控系统, 尤其是用于人工设计的多线程基因电路的表达调控时, 作用稳定性较差, 易受所在基因环境的影响。本研究同样发现在调节不同基因表达时, 相同终止效率的终止子上调 GFP 的水平有差异, 说明其兼容性和模块化程度易受到基因环境的影响。

终止子的从头设计近年被认为是解决这一问题的新思路。由于人工从头设计的终止子不含有无关调控序列, 理论上不会参与到细菌内源基因表达的调控网络中, 因此具备较强的正交性。在大肠杆菌中, 已经建立了天然终止子和合成终止子的模型($R^2=0.81$), 通过现有序列去预测该终止子序列的终止效率^[31]。在本研究的基础上, 接下来可以进一步扩大天然终止子的鉴定范围, 进而探明二者的作用规律, 建立序列和功能之间相关性的模型, 用来反向指导人工终止子的理性设计。

参考文献

- [1] Niu TF, Liu YF, Li JH, Koffas M, Du GC, Alper HS, Liu L. Engineering a glucosamine-6-phosphate responsive glmS ribozyme switch enables dynamic control of metabolic flux in *Bacillus subtilis* for overproduction of N-acetylglucosamine. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(10): 2423–2435.
- [2] Jin P, Kang Z, Yuan PH, Du GC, Chen J. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 21–30.

- [3] Feng J, Gu YY, Quan YF, Cao MF, Gao WX, Zhang W, Wang SF, Yang C, Song CJ. Improved poly- γ -glutamic acid production in *Bacillus amyloliquefaciens* by modular pathway engineering. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 106–115.
- [4] Song YF, Nikoloff JM, Fu G, Chen JQ, Li QG, Xie NZ, Zheng P, Sun JB, Zhang DW. Promoter screening from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications. *PLoS ONE*, 2016, 11(7): e0158447.
- [5] Ding WT, Cheng J, Guo D, Mao L, Li JW, Lu LN, Zhang YX, Yang JK, Jiang HF. Engineering the 5' UTR-mediated regulation of protein abundance in yeast using nucleotide sequence activity relationships. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2709–2714.
- [6] Babina AM, Lea NE, Meyer MM. *In vivo* behavior of the tandem *Glycine* riboswitch in *Bacillus subtilis*. *mBio*, 2017, 8(5): e01602–17.
- [7] Lee Y, Kim SJ, Moon TS. Multilevel regulation of bacterial gene expression with the combined STAR and antisense RNA system. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(3): 853–865.
- [8] Santangelo TJ, Artsimovitch I. Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(5): 319–329.
- [9] Litcofsky KD, Afeyan RB, Krom RJ, Khalil AS, Collins JJ. Iterative plug-and-play methodology for constructing and modifying synthetic gene networks. *Nature Methods*, 2012, 9(11): 1077–1080.
- [10] Cheng JT, Guan CR, Cui WJ, Zhou L, Liu ZM, Li WJ, Zhou ZM. Enhancement of a high efficient autoinducible expression system in *Bacillus subtilis* by promoter engineering. *Protein Expression and Purification*, 2016, 127: 81–87.
- [11] Han LC, Cui WJ, Lin Q, Chen QQ, Suo FY, Ma K, Wang Y, Hao WL, Cheng ZY, Zhou ZM. Efficient overproduction of active nitrile hydratase by coupling expression induction and enzyme maturation *via* programming a controllable cobalt-responsive gene circuit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 193.
- [12] Guan CR, Cui WJ, Cheng JT, Zhou L, Liu ZM, Zhou ZM. Development of an efficient autoinducible expression system by promoter engineering in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 66.
- [13] Cui WJ, Han LC, Cheng JT, Liu ZM, Zhou L, Guo JL, Zhou ZM. Engineering an inducible gene expression system for *Bacillus subtilis* from a strong constitutive promoter and a theophylline-activated synthetic riboswitch. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 1–13.
- [14] Li MJ, Chen HL, Liu CQ, Guo J, Xu X, Zhang HB, Nian R, Xian M. Improvement of isoprene production in *Escherichia coli* by rational optimization of RBSSs and key enzymes screening. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 4.
- [15] Guiziou S, Sauveplane V, Chang HJ, Clerté C, Declerck N, Jules M, Bonnet J. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(15): 7495–7508.
- [16] Ray-Soni A, Bellecourt MJ, Landick R. Mechanisms of bacterial transcription termination: all good things must end. *Annual Review of Biochemistry*, 2016, 85: 319–347.
- [17] You LL, Shi J, Shen LQ, Li LT, Fang CL, Yu CZ, Cheng WB, Feng Y, Zhang Y. Structural basis for transcription antitermination at bacterial intrinsic *Terminator*. *Nature Communications*, 2019, 10: 3048.
- [18] Chen YJ, Liu P, Nielsen AAK, Brophy JAN, Clancy K, Peterson T, Voigt CA. Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nature Methods*, 2013, 10(7): 659–664.
- [19] Du LP, Gao R, Forster AC. Engineering multigene expression *in vitro* and *in vivo* with small terminators for T7 RNA polymerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(6): 1189–1196.
- [20] MacPherson M, Saka Y. Short synthetic terminators for assembly of transcription units *in vitro* and stable chromosomal integration in yeast *S. cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(1): 130–138.
- [21] Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1961, 81(5): 741–746.
- [22] Li R, Zhang Q, Li JB, Shi HL. Effects of cooperation between translating ribosome and RNA polymerase on termination efficiency of the Rho-independent *Terminator*. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(6): 2554–2563.
- [23] de Hoon MJL, Makita Y, Nakai KT, Miyano S. Prediction of transcriptional terminators in *Bacillus subtilis* and related species. *PLoS Computational Biology*, 2005, 1(3): e25.
- [24] Stewart CR, Casjens SR, Cresawn SG, Houtz JM, Smith AL, Ford ME, Peebles CL, Hatfull GF, Hendrix RW, Huang WM, Pedulla ML. The genome of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO₁. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 388(1): 48–70.
- [25] Han LC, Chen QQ, Lin Q, Cheng JT, Zhou L, Liu ZM, Guo JL, Zhang LP, Cui WJ, Zhou ZM. Realization of robust and precise regulation of gene expression by multiple *Sigma* recognizable artificial promoters. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 92.
- [26] Wang ZX, Wei LN, Sheng Y, Zhang GL. Yeast synthetic terminators: fine regulation of strength through linker sequences. *ChemBioChem*, 2019, 20(18): 2383–2389.
- [27] Mairhofer J, Wittwer A, Cserjan-Puschmann M, Striedner G. Preventing T7 RNA polymerase read-through transcription—A synthetic termination signal capable of improving bioprocess stability. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(3): 265–273.
- [28] Curran KA, Morse NJ, Markham KA, Wagman AM, Gupta A, Alper HS. Short synthetic terminators for improved

- heterologous gene expression in yeast. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 824–832.
- [29] Curran KA, Karim AS, Gupta A, Alper HS. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 88–97.
- [30] Turnbough CL Jr. Regulation of bacterial gene expression by transcription attenuation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2019, 83(3): e00019–19.
- [31] Cambray G, Guimaraes JC, Mutalik VK, Lam C, Mai QA, Thimmaiah T, Carothers JM, Arkin AP, Endy D. Measurement and modeling of intrinsic transcription terminators. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(9): 5139–5148.

Gene tandem strategy strengthens the function of terminators and its application in gene expression in *Bacillus subtilis*

Qiao Lin¹, Zhemin Zhou^{1,2}, Wenjing Cui^{1,2*}

¹ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: Using high-property terminators enable significant enhancement of transcription termination, mRNA stability, heterologous gene expression in classic microorganisms. However, design of complex gene circuits was limited by the lack of terminators specifically adapted to *Bacillus subtilis*. **[Objective]** Exploiting new high-performance terminators from *Bacillus subtilis* and further redesigning to enrich the artificial terminators suitable for this chassis. **[Methods]** The terminators from *Bacillus subtilis* and *Bacillus subtilis* phage were respectively constructed into the terminator measurement plasmid to determine the termination efficiency (TE). Multiple tandem terminators were constructed with combinatorial patterns of strong-weak, strong-strong, and weak-weak and subsequently TEs of those tandem terminators were individually determined. The tandem terminators with high TE were harnessed to verify the function of heterologous expression of L-aspartate amino lyase (AspA) and β -glucuronidase (GusA) in *B. subtilis*. **[Results]** The TE of terminator TB5 is 98%, which is strongest among the natural terminators in *B. subtilis*. Meanwhile, expression level of GFP harboring TB5 was up-regulated by 2.2 folds, and the expression level of RFP was down-regulated by 27 folds. For the dual-tandem terminators, the expression levels of RFP regulated by TH1.5b-TB5 (TE=97%) and TB5-TB5 (TE=98%) tandem terminators were decreased by 30 folds. For the triple-tandem terminators, TB2-TB5-TB5 combination no longer increase the expression level of GFP compared with the corresponding dual combination. Nevertheless, the expression of RFP is only 1/300 of the control. Finally, heterologous expression of AspA and GusA confirmed that two tandem terminators, TH1.5b-TB5 and TB10-TB5, significantly improved the gene expression in *B. subtilis*. **[Conclusion]** Strong synthetic terminators are able to reinforce the heterologous gene expression in surrogate host. Importantly, the efficiency of termination is further improved by rational combination of natural terminators in tandem manner. These artificially redesigned terminators could be conveniently and portably constructed into bacterial gene circuits to augment and stabilize gene expression.

Keywords: *Bacillus subtilis*, transcription terminator, tandem terminator, gene expression

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21878125) and by the National Key Research and Development Program (2017YFE0129600)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85197551; E-mail: wjcui@jiangnan.edu.cn

Received: 23 October 2020; Revised: 7 January 2021; Published online: 25 March 2021