

嗜热脂肪芽孢杆菌中耐热蛋白酶基因的克隆

杨庆云 江行娟 吴琳 崔玉良 杨树青

(复旦大学遗传所, 上海)

用鸟枪法把嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1(供体菌)染色体上的蛋白酶基因克隆到质粒pPL603上,并在枯草杆菌中得到表达。此基因位于6.6kb的EcoRI酶切片段上,带有重组质粒的枯草杆菌所产生的蛋白酶活性比供体菌株约提高30倍左右。该酶的最适反应温度为75℃,最适pH为7.0左右,是一个中性蛋白酶,在80℃作用30min后仍保留35%以上的酶活。

关键词 鸟枪法; 基因克隆; 耐热性蛋白酶基因

耐热性蛋白酶反应温度高,具有良好的热稳定性,应用耐热性酶可以缩短反应时间,节省冷却用水,在蚕丝、纺织、食品酿造、医药和洗涤剂等行业上将会产生很大的经济效益。

近年来Sidier, W.Z.^[1]和Takii, Y.等^[2]已经从嗜热脂肪芽孢杆菌中得到耐热的中性蛋白酶,并研究了它们的性状。1983年Mikio, F.等^[3]用基因工程技术克隆到耐热的中性蛋白酶基因,而且克隆

株和供体菌株的性状相似。这方面工作在国内尚未见报道。

本文报道从一株嗜热脂肪芽孢杆菌313-1克隆到一个耐热的蛋白酶基因和克隆菌株的部分性质。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株与质粒: 见表1。

表1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	基因型或表型 Genotype or phenotype	来源或文献 Source or reference
嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 <i>B. stearothermophilus</i> 313-1	Npr ⁺	本所 This Institute
枯草杆菌 DB104 <i>B. subtilis</i> DB104	His ⁻ nprR2 nprF18ΔaprA3	[4]
枯草杆菌 BG2036 <i>B. subtilis</i> BG2036	Δapr 684 ΔnprE522	[5]
质粒 pPL603 plasmid pPL603	Km ^r	[6]

2. 培养基: (1)液体培养基: 蛋白胨(大五营养化学株式会社)1%, 酵母粉(英国Oxoid)0.5%, 氯化钠0.5% pH 7.2-7.4。(2)固体培养基: 液体培养基加

2%琼脂粉。(3)选择性培养基(LKM):

本文于1989年9月13日。

本工作得到盛祖嘉、沈仁权两教授的指导和帮助特此致谢。

固体培养基加 1.5% 脱脂奶粉和卡那霉素 (终浓度 10 μ g/ml)。(4) 制备感受态细胞用培养基: 参照文献[7]配制。(5) 基本培养基——50 E; 参照文献[8]配制。

(二) 方法

1. 质粒DNA提取: 参照文献[9], 用碱法制备DNA, 再用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心加以纯化。

2. 染色体DNA的提取: 参照文献[10]。

3. 酶切和连接: 参照文献[9]方法进行, 所用酶均为Biolabs公司产品。

4. 质粒DNA转化: 按文献[11]方法进行并稍有改良, 采用枯草杆菌感受态细胞转化, 在选择性培养基上选择有透明圈的菌落。

5. 蛋白酶粗制剂的制备: 含重组质粒的菌株和供体菌株用含 2mmol/L Ca²⁺的液体培养基 (加抗生素或不加), 在 37 $^{\circ}$ C 或 55 $^{\circ}$ C 分别培养 42h, 6000rpm 离心 10min, 取上清液, 用 85% 饱和度硫酸铵在 4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜, 6500rpm 离心 10min 取沉淀, 用少量缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5mmol/L CaCl₂) 溶解, 并对该缓冲液透析 (4 $^{\circ}$ C) 过夜。

6. 蛋白酶活性测定: 参照文献[12]的Folin酚法, 即 1 ml 酶液在 60 $^{\circ}$ C 下水解 1 ml 2% 酪蛋白 10min 后, [1' 每分钟释放出 1 μ g 酪氨酸的酶量为一个活力单位。

7. 蛋白含量测定: 参照文献[13]。

8. 测定酶的最适反应温度: 在各种温度中处理一定时间后, 测定酶活性。

9. 质粒的 Southern 吸印法杂交: 用 Biotin-11-dUTP 作为标记物掺入克隆子 DNA 作为探针, 用 DNA 测定系统检测。Southern 转移法, 切口移动法及杂交、染色法都按操作手册进行。

10. 蛋白酶 pH 稳定性的测定: 参照

文献[16]。

结 果

(一) 耐热蛋白酶基因的克隆

从嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 抽提到的染色体DNA和载体DNA分别用 EcoRI 消化, 然后按 5:1 比例混合, 经 T4 连接酶连接。用已连接好的DNA样品和载体DNA分别转化枯草杆菌 DB104 的感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 表达 90min, 涂布于 LKM 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 结果在连接样品的转化平板中出现一个形成透明圈的菌落, 而用载体DNA得到的转化子则在 LKM 平板上不形成透明圈 (图 1)。

将上述有透明圈菌落再在 LKM 平板上划线分离, 培养后得到的菌落大部分有透明圈。随机挑取几个有透明圈的菌落用

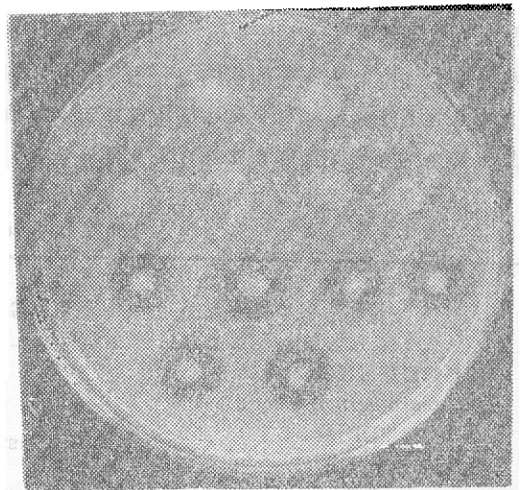


图 1 在 LKM 平板上转化子的性状

Fig. 1 Assay for extracellular protease on LKM agar plate

无透明圈: 枯草杆菌 DB104 (含载体质粒 DNA)
No halos: *B. subtilis* DB104 (vector plasmids DNA)

有透明圈: 枯草杆菌 DB104 (含重组质粒 DNA)
With halos: *B. subtilis* DB104 (recombinat plasmids DNA)

快速法抽提其中的重组质粒 DNA 和载体 DNA,分别再转化枯草杆菌 DB 104(原宿主)和另一蛋白酶缺失菌株枯草杆菌 BG 2036 的感受态细胞,结果以载体 DNA 转化上述二个菌株得到的转化子在选择平板上都不产生透明圈,而用重组质粒 DNA 转化得到的转化子则都产生透明圈(图1)。将有透明圈和无透明圈的转化子再次在 LKM 平板上复测,结果相同。

挑取有透明圈的菌落,经培养后用快速法抽提 DNA,将此 DNA 用 EcoR I 酶切后电泳观察,发现有二个片段,一个与载体(EcoR I 切)一样大,另一个为 6.6kb 的插入片段(图 2)。因此可以初步肯定已

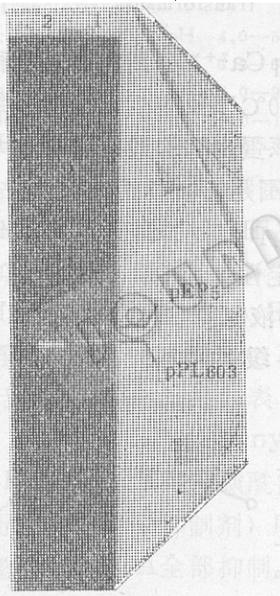


图 2 载体和重组质粒 DNA 的 EcoR I 酶切片段

Fig.2 Fragment of vector and recombinant DNA (digested by EcoR I)
1. pEP5; 2. pPL603

的性状完全相似,说明转化子的宿主细胞确是受体菌。

(二) Southern 吸印法杂交

pEP5 和 pPL603 DNA 用 EcoR I 酶切后,分别用 Biotin-11-dUTP 标记作为杂交探针,分别和吸附在硝酸纤维素上的酶切后的染色体 DNA 进行分子杂交,染色的结果如图 3,当以 pEP5 为探针时,在 pEP5 插入片段相应位置的染色体上有清晰的杂交条带,而以 pPL603 为探针时,并不能在染色体相应部位杂交出任何条带,因此该插入片段确实来自嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 的染色体 DNA。

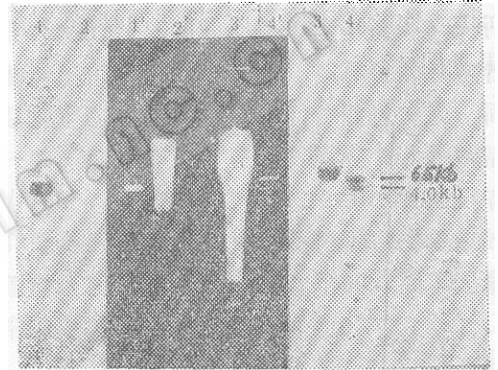


图 3 重组质粒分子杂交图

Fig.3 Southern-blot of recombination plasmid 1'-4'. Photography of gel electrophoresis 1'. Vector DNA digested by EcoR I; 2', 3'. Chromosome DNA digested by EcoR I; 4'. Recombination plasmid DNA digested by EcoR I
1-4. Chromatography of biotin hybridization 1, 2. Vector DNA as probe; 3, 4. Recombination DNA as probe

(三)嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 和克隆株枯草杆菌 DB104 (pEP5) 的蛋白酶活力测定

嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 和枯草杆菌 DB104 (pPEP5) 分别在 55°C 和 37°C 培养 42h 的发酵液,在 60°C 下精确反应 10min 后测定酶活性,结果如表 2。从酶活性看带有重组质粒的枯草杆菌 DB104 所产生的蛋白酶比供体菌 313-1 高 30 倍。

克隆到染色体 DNA 中的一个蛋白酶基因。它的重组质粒称为 pEP5, 宿主为 DB104, 标记为枯草杆菌 DB104 (pEP5)。

随机挑取几个产生透明圈的菌落,用基本培养基作生长谱试验,它们与受体菌

表 2 蛋白酶活性的测定
Table 2 Protease activity detection

菌 株 Strain	酶 活 性 Enzyme activity (u/ml)
<i>B. stearothermophilus</i> 313-1	4.88
<i>B. subtilis</i> DB104(pPL603)	1.18
<i>B. subtilis</i> BG2036(pPL603)	1.42
<i>B. subtilis</i> DB(pEP5)	145.1

(四)蛋白酶的基本特性

1. 嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 和枯草杆菌 DB104(pEP5) 蛋白酶的最适反应温度: 含2mmol/L Ca²⁺的稀释酶液与2%酪蛋白溶液混合, 在各种温度下保温10 min, 比较在不同反应温度时的酶活, 结果见图4。

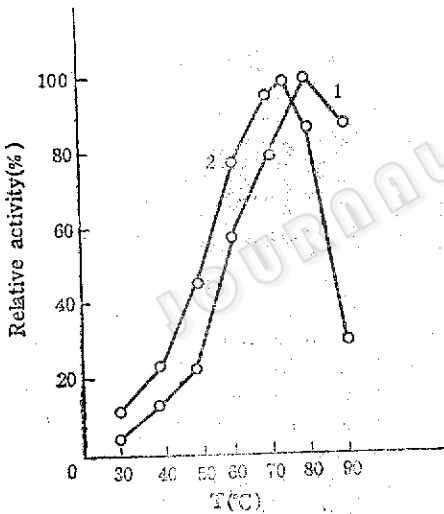


图 4 蛋白酶的最适反应温度
Fig.4 Optimum reaction temperature of protease
1. 313-1; 2. DB104(pEP5)

2. 枯草杆菌 DB104(pEP5) 蛋白酶的耐热性: 将含 2mmol/L CaCl₂ 的稀释酶液与 2% 的酪蛋白溶液混和, 在不同温度下保温不同时间后测定酶活性, 结果见图5。

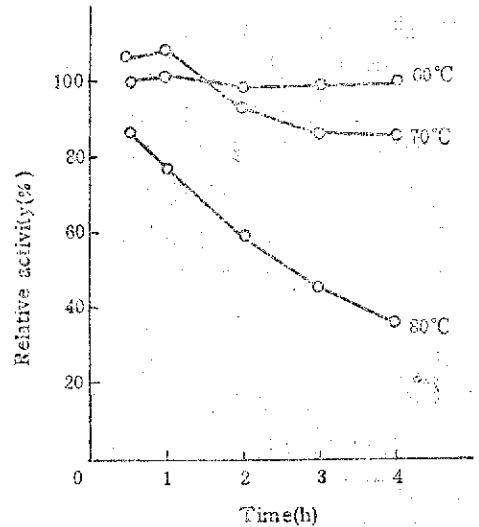


图 5 克隆株蛋白酶的耐热性
Fig.5 Thermostability of protease in transformants

液(不加 Ca²⁺)配制的酶制剂和酪蛋白溶液, 在60°C下反应后测酶活, 结果从图6中可见该蛋白酶的最适作用pH为7.0, 最适pH范围是6.0~7.5。

4. pH对枯草杆菌DB104(pEP5)蛋白酶稳定性的影响: 粗酶浓缩液用不同pH缓冲液稀释后, 37°C保温2h, 再用pH 7.5Tris缓冲液稀释, 然后测酶活, 如图

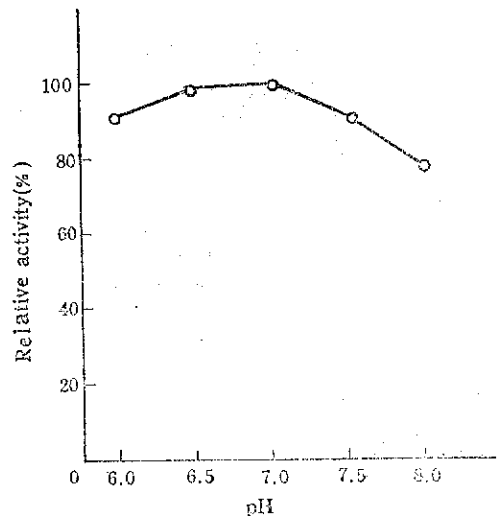


图 6 蛋白酶的最适pH
Fig.6 Optimum pH of protease

3. 枯草杆菌 DB104(pEP5) 蛋白酶作用的最适pH: 用不同 pH值的磷酸缓冲

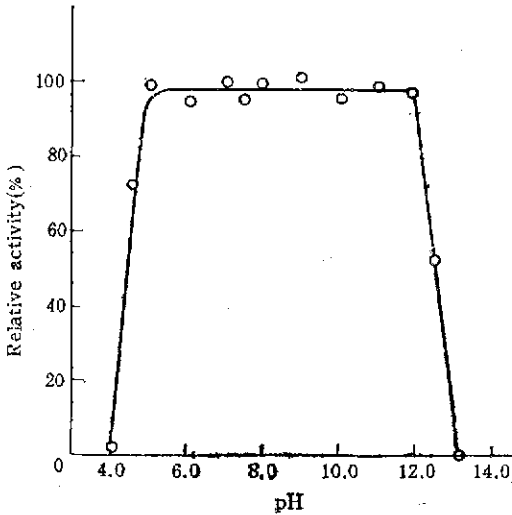


图 7 克隆菌株蛋白酶的 pH 稳定性曲线
Fig.7 pH stable curve of protease of transformant

HAc-NaAc,	pH 4.0—5.6
C ₄ H ₃ O ₄ Na-NaOH,	pH 5.2—6.8
Tris-HCl,	pH 7.0—9.0
H ₃ BO ₃ -NaOH,	pH 9.0—11.0
KCl-NaOH,	pH 12.0—13.0

7 所示, 枯草杆菌 DB104(pEP5) 的蛋白酶在 pH5—12 之内, 酶活性仍保持恒定。

5. 抑制剂对酶活性的影响: 酶制剂用无 Ca²⁺ 缓冲液溶解后加入 EDTA 和 PMSF, 再测定酶活性, 同时以不加抑制剂的酶样品作为对照, 结果如表 3 所示, 此酶几乎不被 PMSF (Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride, 苯甲基磺酰氟化物, 是丝氨酸蛋白酶的专一抑制剂) 所抑制, 而被金属螯合剂 EDTA 全部抑制。由此证实从嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 克隆到的是

表 3 抑制剂对酶活性的影响

Table 3 Effect of different inhibitor on enzyme activity

抑制剂 Inhibitor(mmol/L)	酶活性 Activity (%)
0	100
EDTA (1)	0.18
EDTA (5)	0.00
PMSF (1)	92.08
PMSF (5)	86.56

一个中性蛋白酶基因。由于该酶活性的保持绝对需要 Ca²⁺, 所以这一酶属金属蛋白酶。

讨 论

我们从嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 中克隆到一个耐热的蛋白酶基因, 该基因的性状能在两株蛋白酶缺失的枯草杆菌中得到表达, 而且酶活比供体菌株高。重组质粒 pEP5 中含有 6.6kb 的插入片段。次级克隆和基因的序列分析有待于进一步研究。

前已提及, 耐热蛋白酶的最适反应温度为 75°C, 从图 5 中可看到 60°C 保持 4h 酶活仍恒定。而目前所用酶单位的测定都是规定在 37°C 反应。我们曾做过比较, 同一酶样品, 测定时在 60°C 反应 10min 酶活为 100%, 而在 37°C 反应 10min 酶活只有 33%, 因此我们认为对耐热蛋白酶单位的测定, 在反应温度上应选用 60°C 而不是象常温菌的蛋白酶测定那样为 37°C。

从嗜热脂肪芽孢杆菌 313-1 克隆到的中性蛋白酶与日本 Mikio, F. 等^[3]从嗜热脂肪芽孢杆菌 CU21 克隆的耐热蛋白酶一样, 在缺 Ca²⁺ 时极不稳定。当在培养基中添加 Ca²⁺ 后不仅可提高酶的稳定性, 而且还能提高酶活。并且已知枯草杆菌的中性蛋白酶和嗜热菌蛋白酶 (Thermolysin) 的稳定性都与 Ca²⁺ 的存在有关。Yumiko, O.^[15]报道酶液用 EDTA 透析除去 Ca²⁺ 后酶活便丧失, 枯草杆菌的中性蛋白酶和嗜热菌蛋白酶结构中全无 -S-S- 键, 显然它们是靠 Ca²⁺ 来稳定酶构象的。

克隆株蛋白酶的最适反应温度 (75°C) 比供体菌的 (80°C) 略低, 此是否在常温菌中耐热性的表达受限制的缘故, 还是其他原因, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sidler, W. Z., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10:197-209, 1980.
[2] Takii, Y. et al., *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, 27:186, 1987.
[3] Mikio, F. et al., *J. Bac.*, 154:831, 1983.
[4] Kawamura, F. and Doi, R. H., *J. Bac.*, 160:442, 1984.
[5] Maria, Y. Y. et al., *J. Bac.*, 160:15, 1984.
[6] Donna, M. W. et al., *J. Bac.*, 146:1162, 1981.
[7] Dub-nau, D. and Davidoff-Abelson R., *J. Mol. Biol.*, 56:209, 1971.
[8] 江行娟等, 遗传学报, 8:1, 1981.
[9] Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
[10] 任大明等, 生物工程学报, 3:197, 1987.
[11] Gryczan, T. J. et al., *J. Bac.*, 134:318, 1978.
[12] 周德庆主编: 微生物学实验手册, 上海科学技术出版社, 1986.
[13] George, R. S., *Anal. Biochem.*, 51:654, 1973.
[14] Hiroshi, U. et al., *J. Bac.*, 139: 583, 1979.
[15] Yumiko, O., *J. B. C.*, 242:509, 1987.
[16] 蔡武城等: 生物化学实验技术教程, 复旦大学出版社, 1983.

Cloning of a Thermostable Neutral Protease Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*

Yang Qingyun Jiang Xingjuan Wu Lin

Cui Yuliang Yang Shuqing

(Genetics Institute, Fudan University, Shanghai)

The structural gene for a thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* (313-1) was cloned in plasmid pPL603 and was expressed in *Bacillus subtilis*. The gene for protease is coded on a 6.6kb EcoRI fragment. *B. subtilis* carrying the recombinant plasmid produced about 29-fold more protease than the wildtype strain of *B. stearothermophilus* (313-1) did. Some properties of proteases partially purified from the transformants of *B. subtilis* were examined. The protease is characterized as neutral one in pH, has an optimum reaction temperature of 75°C and retains above 85% of its activity even after treatment of 80°C for 30 min.

Key words

Shot-gun; gene clone; thermostable neutral protease gene