

## 芽孢杆菌分泌型表达载体的构建

辛 丰\* 蒋如璋

(南开大学生物系生物工程研究室, 天津)

以地衣芽孢杆菌 (*B.licheniformis*)  $\alpha$ -淀粉酶信号肽编码区为基础构建了具有 Pst I、Nhe I、Sma I、BamH I、Sal I 多酶切点的芽孢杆菌分泌型载体 pAMY403, 其分泌效率与质粒 pAMY 413 相同, 而表达水平提高了 50%, 并能使外源  $\beta$ -内酰胺酶基因正常表达和分泌。

质粒 pAMY403 的多酶切点可以满足外源基因插入产生非融合蛋白质, 也可满足以三种不同读码框架插入外源基因产生融合蛋白质, 因而能适应构建不同分泌型工程菌株的要求。

**关键词** 分泌型载体; 质粒 pAMY403; 芽孢杆菌; 多酶切点接头

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 具有高活性蛋白质分泌系统, 因而作为基因工程受体系统一直受到人们的重视。一些实验室已构建了一系列分泌型载体<sup>[1-3]</sup>, 并以它们为载体将多种外源可分泌蛋白质产物分泌到胞外<sup>[4-8]</sup>。另一些实验室则利用编码可分泌蛋白质的基因作为材料进行分泌机制的研究。对信号肽的结构与功能<sup>[7-9]</sup>、胞外蛋白质运输的过程<sup>[10-12]</sup>以及结构基因在分泌中的作用<sup>[13, 14]</sup>等作了剖析。

本文报道利用已克隆<sup>[15]</sup>并且核苷酸序列已知<sup>[16]</sup>的 *B.licheniformis*  $\alpha$ -淀粉酶基因为材料, 构建了可做为外源基因产物表达和分泌的分泌型载体, 并以 *B.licheniformis*  $\beta$ -内酰胺酶基因作为外源基因验证了其应用的可能性。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

1. 菌株和质粒: 本文所用的菌株和质粒见表 1。 *B. subtilis* AS 1.1176 系

*B. subtilis* 168 的一个衍生株。质粒 pAMY413 是 pAMY 41<sup>[16]</sup> 的一个衍生质粒, 携带 *B.licheniformis* ATCC27811  $\alpha$ -淀粉酶基因的 3.2kb 的 Hind III-Bgl II 限制酶酶切片段。

2. 酶及试剂: 限制酶、T4DNA 连接酶、RNA 酶和 DNA 酶、DNA 聚合酶 I (Klenow fragment)、Mung Bean 核酸酶和溶菌酶购自华美生物工程公司或中国医学科学院基础所, 并按厂家推荐的方法使用。聚乙烯醇(PVA)为 Rhodia 公司产品。用于酶活测定的可溶性淀粉购自英国 BDH 公司。其它药品均为国产试剂。

### (二) 方法

1. 培养基: LB 培养基<sup>[18]</sup>用于细菌培养和 *E. coli* 感受态培养, LBS 培养基含 0.5% 淀粉和 1% 琼脂粉。SMMP 和 DM 3 培养基<sup>[19]</sup>用于 *B. subtilis* 原生质体转化。

2. DNA 的制备及纯化: *E. coli* 质

本文于 1990 年 7 月 14 日收到。

“863”基础研究, 由国家自然科学基金资助。

\* 现在天津市河东医院工作。

表 1 菌株与质粒  
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	基因型或表现型 Genotype or phenotype	来 源 Source
<i>F.coli</i> LE392	hsdS14 supE44 supF58 lacY galK2 galT22 metB1 trpR55	Lab. stock
<i>B.subtilis</i> AS1.1176	aroD amy4 str <sup>-</sup>	Institute of Microbiolo Academia Sinica
pUC13	Ap <sup>r</sup>	Lab.stock
pGTES-E4-B7	Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	Depart.of Biology Beijing University
pAmy413	Km <sup>r</sup> Amy <sup>+</sup>	This lab.
pKA300	Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This lab.
pAmy403	Km <sup>r</sup> Amy <sup>+</sup>	This study
pKA301	Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This study

粒提取按 Maniatis 等方法<sup>[18]</sup>。

*B.subtilis* 质粒提取按 Birnboim 和 Doly 法<sup>[20]</sup>。

DNA 片段的制备及纯化采用琼脂糖电泳法<sup>[18]</sup>, 电泳完毕将所需 DNA 带切出, 用美国 Bio-Rad 公司生产的 422 型电泳洗脱仪制备, 收集 DNA 并用酚: 氯仿 (1:1) 抽提 2—3 次, 氯仿抽提一次, 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc, 乙醇沉淀, 离心即得纯化的 DNA 片段。

3. 遗传转化: *E.coli* 转化按 Maniatis 等方法<sup>[18]</sup>。 *B.subtilis* 原生质体转化按 Chang 和 Cohen<sup>[19]</sup> 法。选择性培养基含抗菌素量分别为 Cm 20 μg/ml, Km 20 μg/ml, Ap 50 μg/ml, 用 DM<sub>2</sub> 培养基筛选抗性转化子时 Km 为 1 mg/ml, Cm 10 μg/ml。

4. 酶活性测定: 平板检测采用含淀粉的 LBS 培养基, 待长成菌落后按蒋如璋等<sup>[15]</sup> 方法检测 Amy<sup>+</sup> 菌落。α-淀粉酶活力测定采用二硝基水杨酸法<sup>[21]</sup>。酶活性单位定义为每毫升酶液每分钟水解淀粉释放出 1 μmol 还原糖的酶量。

β-内酰胺酶阳性菌落的平板检测采用 Sherratt<sup>[22]</sup> 法进行。酶活性测定按

Perret<sup>[23]</sup> 法。

## 结 果

### (一) 分泌型载体 pAMY403 的构建

芽孢杆菌分泌型载体系统 pAMY403 的构建过程见图 1。

1. 穿梭质粒 pAMY400 的构建: 由碱基序列<sup>[16]</sup> 推知 *B.licheniformis* α-淀粉酶信号肽由 29 个氨基酸组成, 信号肽 C-末端编码区有一个 Pst I 限制酶切点。所以, 以 Pst I 酶切质粒 pAMY 413 和 pUC13, 使两者都成线性分子, 再以 T4 DNA 连接酶连接转化 *E.coli*, 筛选 Ap<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> 转化子, 经酶切验证即得到穿梭质粒 pAMY400。

2. 质粒 pAMY402 的构建: 以限制酶 Hind III 和 Sac I 酶切质粒 pAMY400, 电泳制备携带淀粉酶基因的 6.2kb 的 DNA 片段, *E.coli* DNA 聚合酶 I (Klenow fragment) 补平粘末端后, 以 T4 DNA 连接酶连接并原生质体转化 *B.subtilis* AS 1.1176, 筛选 Km<sup>r</sup>, 所得质粒即为 pAMY 402。

与 pAMY413 相比, pAMY402 在信

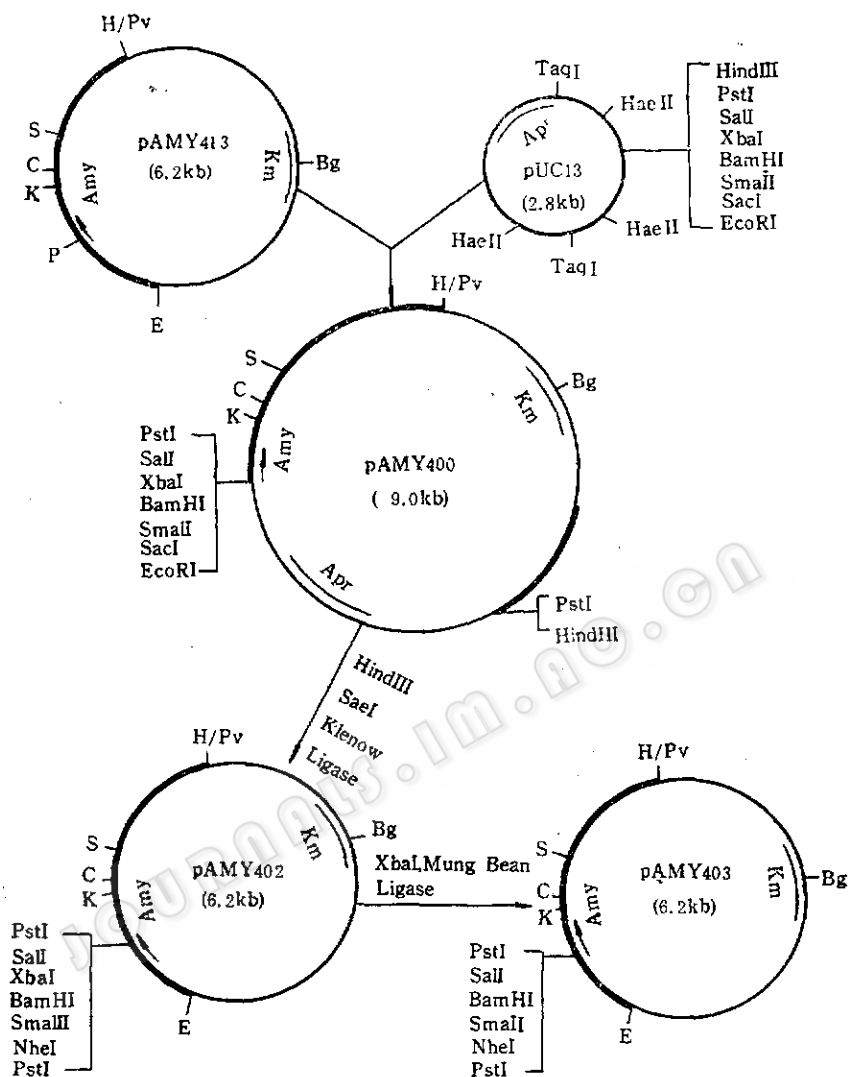


图 1 质粒pAMY403的构建

Fig.1 Construction of plasmid pAMY 403

Bg=Bgl I, C=Cla I, E=EcoR I, H=Hind III,  
K=Kpn I, Pv=Pvu I, S=Sal I

号肽编码区的 Pst I 位点后面插入了 Nhe I、Sma I、BamH I、Xba I、Sal I 和 Pat I 多酶切位点。其中 Nhe I 切点是 Hind III、Sac I 粘性末端填平连接后再生的。

由于多酶切点的插入破坏了淀粉酶基因的读码框架 (图 2), 因而 *B. subtilis* (pAMY402) 的表型为 Amy<sup>-</sup>。

3. 质粒 pAMY403 的构建: 为了检测插入多酶切点后对  $\alpha$ -淀粉酶分泌的影响, 故对 pAMY402 的读码框架进行了调整。将质粒 pAMY402 DNA 以 Xba I 酶切, 并以 Mung bean 核酸酶将粘末端削平, T4DNA 连接酶连接后转化 *B. subtilis*, 筛选 Km<sup>r</sup> Amy<sup>+</sup> 转化子, 其物理图谱与预期的一致, 即为 pAMY403。

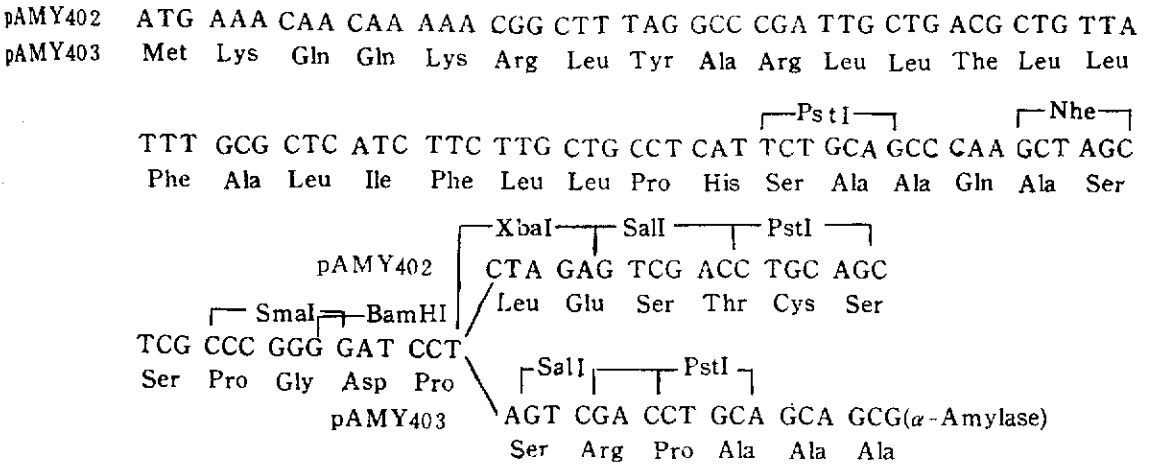


图 2 质粒pAMY402和pAMY403信号肽区的结构  
 Fig.2 Structure of signal peptide region of plasmids pAMY402 and pAMY403  
 箭头示信号肽酶 I 识别切割位点  
 Arrow shows the recognition and cleavage site of signal peptidase I

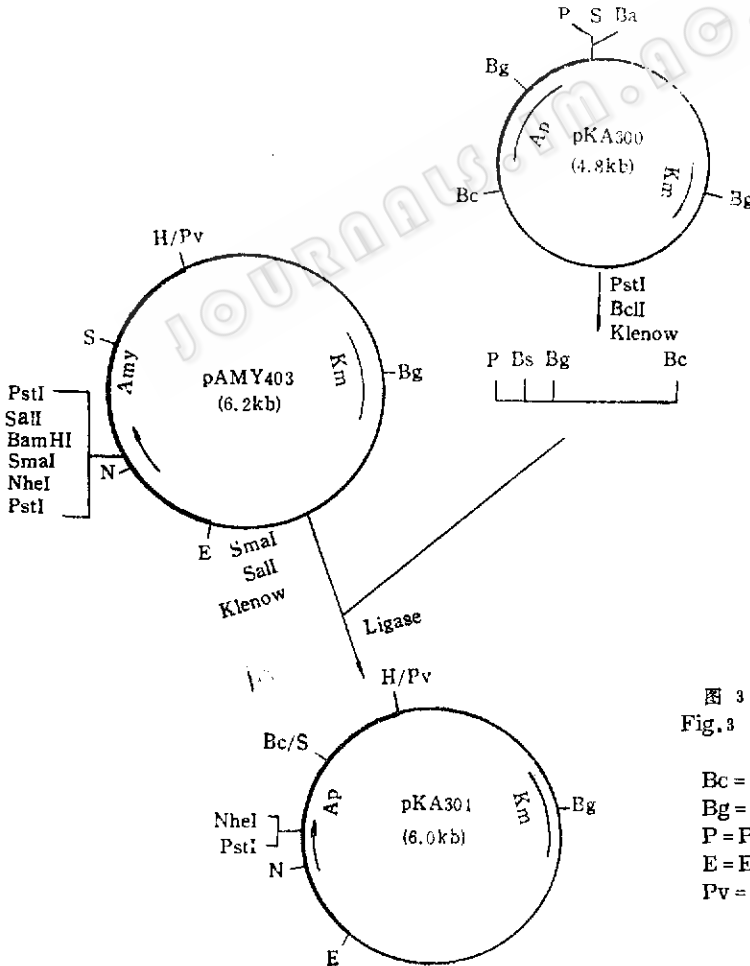


图 3 质粒pKA301的构建  
 Fig.3 The construction of  
 plasmid pKA301  
 Bc = Bcl I, Bs = Bsm I,  
 Bg = Bgl I, Ba = BamHi,  
 P = Pst I, N = Nde I,  
 E = EcoR I, H = Hind I,  
 Pv = Pvu I, S = Sal I

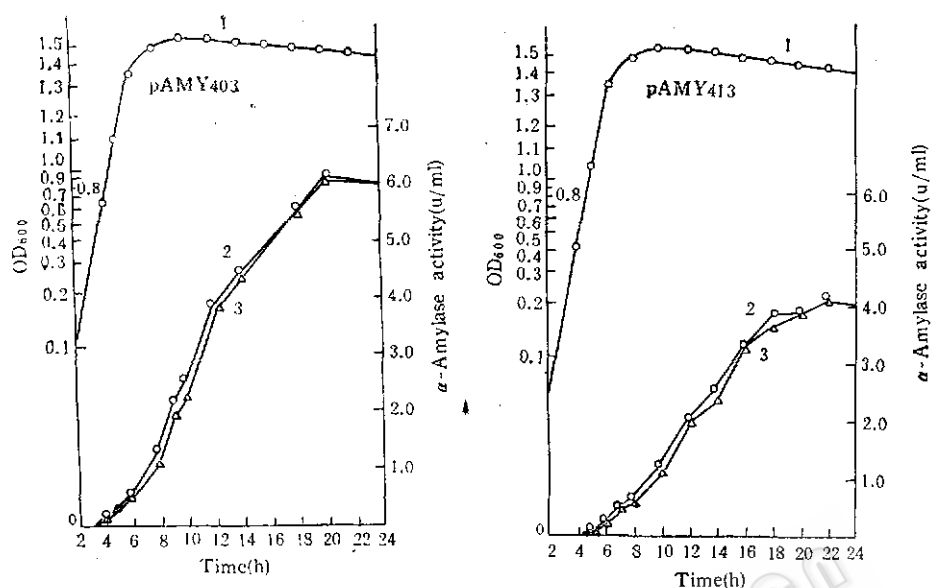


图 4 *B. subtilis* (pAMY403)和*B. subtilis*(pAMY413)的胞外和总酶活性增长曲线

Fig.4 Growth and enzyme activity curves of strains *B. subtilis* (pAMY403) and *B. subtilis* (pAMY413)

1. Growth curve, 2. Total activity, 3. Extracellular activity

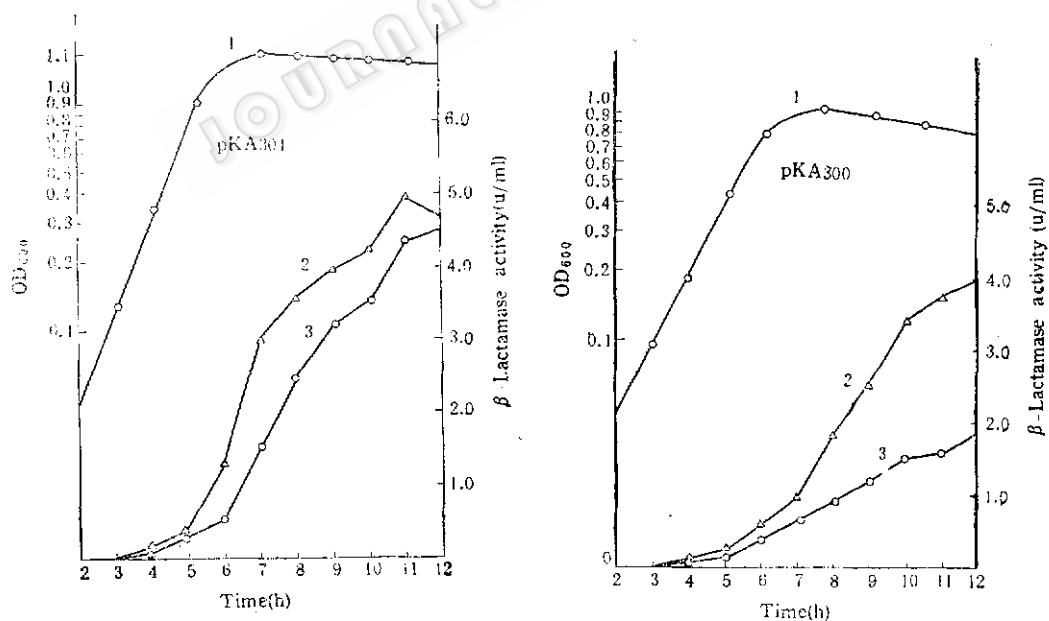


图 5 *B. subtilis* (pKA301)和*B. subtilis*(pKA300)的胞外和总酶活性增长曲线

Fig.5 Growth and enzyme activity curves of *B. subtilis* (pKA301) and *B. subtilis* (pKA300)

1. Growth curve, 2. Total activity, 3. Extracellular activity

## (二) 质粒pKA301的构建

质粒 pKA300 DNA以Pst I 和 Bcl I 双酶切, 制备携带 $\beta$ -内酰胺酶基因的约 1 kb的无自身启动子的 DNA 片段<sup>[17]</sup>, 然后以 DNA聚合酶 I (Klenow fragment) 补平粘末端, 作为供体基因片段; 质粒 pAMY403 DNA以Sal I 和Sma I 酶切, 同法补平粘末端, 作为载体质粒。两者经 T4DNA连接酶连接, 转化*B. subtilis*筛选 Km<sup>r</sup>转化子。菌落点接 LB-PVA 平板, 挑出Km<sup>r</sup>Pen<sup>r</sup>菌落, 质粒DNA 经酶切分析结果与预期一致者即为 pKA 301 (图 3)。

## (三) 淀粉酶和 $\beta$ -内酰胺酶的产生及分泌作用

*B. subtilis* (pAmy403) 和 *B. subtilis*

(pKA301) 分别接种 LB 培养基, 37℃ 摇床培养, 定时取样分别测定上清液酶活性及总酶活性, 结果见图 4 和图 5。由图 4 可见 *B. subtilis*(pAMY403) 和 *B. subtilis* (pAMY413) 相比其表达水平比后者提高了约50%。

由图5可见 *B. subtilis*(pKA301) 的分泌效率明显高于 *B. subtilis*(pKA300)。已知 *B. licheniformis*  $\beta$ -内酰胺酶的分泌作用是信号肽酶 II 参与加工过程<sup>[24]</sup>, 由于翻译时或翻译后半胱氨酸的氨基被脂化修饰附着于细胞膜外侧而不能被快速分泌到介质中去 (表 2, pKA300); *B. subtilis* (pKA301) 的分泌效率高于是 *B. subtilis* (pKA300) 表明前者的分泌作用主要是  $\alpha$ -淀粉酶基因编码的信号肽及信号肽酶 I 参

表 2 不同培养时间  $\beta$ -内酰胺酶胞外与总酶活性

Table 2 Totall and extracellular activity of  $\beta$ -lactamase at different incubation time

培养时间 Incubation time (h)	pKA300			pKA301		
	胞外酶活性 Extracellular activity (A)	总酶活性* Total activity (B)	A/B (%)	胞外酶活性 Extracellular activity (A)	总酶活性* Total activity (B)	A/B (%)
8	0.9	1.81	50	2.52	3.53	71
9	1.17	2.50	47	3.24	4.05	80
10	1.47	3.40	43	3.50	4.26	82
11	1.60	3.73	43	4.35	4.95	89
12	1.83	3.93	46.7	4.50	4.75	94

\* 总酶活系菌悬液经超声波处理后的测定值

Total activity of the enzyme was assayed after sonication of the cell suspension

与加工的过程。

## 讨 论

本文以 *B. licheniformis*  $\alpha$ -淀粉酶基因的启动子及其信号肽编码序列构建了带有多酶切位点的分泌型表达载体 pAMY 403。无启动子的 *B. licheniformis*  $\beta$ -内酰胺酶结构基因插入质粒 pAMY403的 Sma I 位点, 可以在淀粉酶基因的启动子和信号肽指令下表达, 并将80%以上的 $\beta$ -内酰

胺酶分泌到胞外。比较 *B. subtilis* (pKA 301) 与 *B. subtilis*(pKA300) 的分泌效率观察到两者有明显的区别, 这可以解释为后者的分泌作用是信号肽酶 II 参与的过程, 而前者则主要是 $\alpha$ -淀粉酶信号肽和信号肽酶 I 参与的过程。由于在构建质粒 pKA 301时, 带有 $\beta$ -内酰胺酶基因的Pst-Bcl片段仍保留着 $\beta$ -内酰胺酶信号肽疏水核心和信号肽酶 II 识别序列-Leu-Ala-Gly-Cys 的编码序列 (图 6), 如图所示位点 I 和 II 之间正好为 $\beta$ -内酰胺酶疏水核心

区。-Leu-Ala-Gly-Cys-虽在信号肽酶 I 切割位点之后,但仍可被信号肽酶 II 识别和被脂化修饰<sup>[25]</sup>。这一解释与图 4、5 以及表 2 的结果一致。

分泌型载体 pAMY403 的信号肽编码区后面插入多酶切位点接头后扩大了其适

用范围。

$\alpha$ -淀粉酶信号肽的信号肽酶识别切割位点变为-Ala-Gln-Ala-Ser-后淀粉酶基因的表达水平提高了 50%(图 4)。这一结果与 Ohmura 等<sup>[8]</sup>相似。

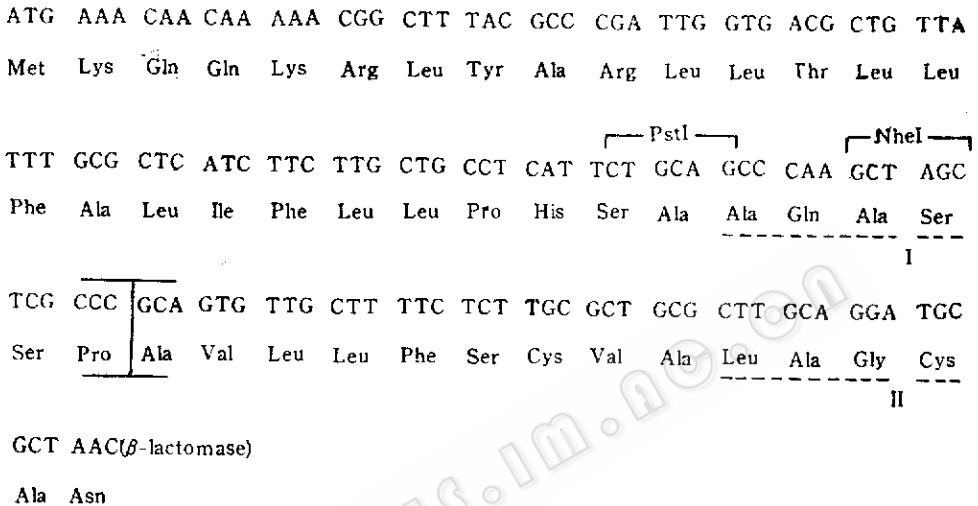


图 6 质粒 pKA301 信号肽区域的结构

Fig.6 Structure of signal peptide region of plasmid pKA301

---- 表示信号肽酶 I 和 II 识别位点

---- Recognition and cleavage sites for signal peptidase I and II

I 表示融合位点 Fusion site

## 参 考 文 献

- [1] Palva, I., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5582-5586, 1982.
- [2] Ohmura, K., et al., *J. Biochem.*, 95:87-93, 1984.
- [3] Wong, S.L., et al., *J. Bact.*, 168:1005-1009, 1986.
- [4] Palva, I., et al., *Gene*, 22:229-235, 1983.
- [5] Shiroza, T., et al., *Gene*, 34:1-8, 1985.
- [6] Ulmanen, I., et al., *J. Bact.*, 162:176-182, 1985.
- [7] Imanaka, T., et al., *J. Gen. Microbiol.*, 131:1753-1763, 1985.
- [8] Ohmura, K., et al., *Nucl. Acid Res.*, 12:5307-5319, 1984.
- [9] Abrahamsen, L., et al., *EMBO J.*, 4:3901-3906, 1985.
- [10] Ibrahim, I., and Gentz, R., *J. Biol. Chem.*, 262:10189-10194, 1987.
- [11] 周毅和蒋如璋, *中国科学B辑*, 9:942-951, 1990.
- [12] Thom, J.R. and Randall, L.L., *J. Bact.*, 170:5654-5661, 1988.
- [13] Koshland, D. and Boststein, D., *Cell*, 20:749-760, 1980.
- [14] Ito, K. and Beckwith, J., *Cell*, 25:143-150, 1981.
- [15] 蒋如璋等, *遗传学报*, 14:323-331, 1987.
- [16] Yuuki T., et al., *J. Biochem.*, 98:1147-1156, 1985.
- [17] Neugebauer K., et al., *Nucl. Acid Res.*, 9:2577-2588, 1981.
- [18] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab, New York, 1982.

- [19] Chang S., et al., MGG, 168:111—115, 1979.  
[20] Birnboim et al., Nucl. Acid Res., 7:1513—1523, 1979.  
[21] 张树政等, 工业酶制剂(上册), 科学出版社, 1984.  
[22] Sherratt D.J., et al., J. Gen. Microbiol., 76:217—230, 1973.  
[23] Perret, H., Nature, 174:1012—1013, 1954.  
[24] Hayashi, S., et al., J. Biol. Chem., 260:5753—5759, 1985.  
[25] Chrayeb J., et al., J. Biol. Chem., 260:10961—10965, 1985.

## Construction of a Secretion-expression Vector of *Bacillus*

Xin Feng Jiang Ruzhang

(Department of Biology, Nankai Univ., Tianjin)

A *Bacillus* protein secretion-expression vector pAMY403 has been constructed based on the promoter and signal sequence coding region of  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus licheniformis*. It possesses a polylinker with the restriction sites of Pst I -Nhe I -Sma I -BamH I -Sal I after signal peptide coding region. The  $\alpha$ -amylase gene carried by plasmid pAMY403 in *B. subtilis* can be expressed and secreted as its parental plasmid pAMY413. When  $\beta$ -lactomase gene from *B. licheniformis* is cloned at SmaI sites of pAMY403, it can express and secret normally.

Polylinkers of plasmid pAMY403 provide cloning sites both for inserting heterogenes to produce non-fusion protein (e.g. insert at NheI or PstI site) and for protein fusion in different reading frames at other restriction sites. Therefore plasmid pAMY403 can adapt to any project of constructing chimeric secretion plasmid in *B. subtilis*.

### Key words

Protein secretion vector, pAMY403, *Bacillus subtilis*