

低温菌启动子分析及异源蛋白高效表达

魏云林, 季秀玲, 林连兵, 井申荣

昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明, 650224

摘要: 在已构建的能在低温菌和 *E. coli* 中正常复制的启动子探针质粒的基础上, 筛选到了强启动子, 通过 RT-PCR 评估了启动子活性, 并通过引物延伸实验确定了转录起始位点和启动子核心序列。利用其中最强的启动子构建了低温蛋白表达质粒, 使一个热不稳定 α -淀粉酶在低温下 (7°C) 得到了高效表达, 表达量达胞外总蛋白的 35%。显示出该表达系统具有高效表达热不稳定蛋白质的潜在应用价值。

关键词: 启动子, 表达系统, 热不稳定蛋白质

The Analysis of Promoters and the Effective Expression of Exogenous Proteins in a Cold-adapted Bacterium

Yunlin Wei, Xiuling Ji, Lianbing Lin, and Shenrong Jing

Biotechnology Research Center of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

Abstract: Based on the constructed promoter probe vectors that could replicate both in *E. coli* and in a cold-adapted bacterium, several candidate promoters were isolated and their activities were evaluated by RT-PCR. The transcription initiation sites and core sequence of promoters were determined by primer extension analysis. A low-temperature expression vector was constructed by using the strongest promoter and a thermolabile α -amylase gene was successfully overproduced under control of this promoter at low temperature (7°C), while the secreted α -amylase amounted up to 35% of the total extracellular proteins. The expression system is expected to be useful for the production of thermolabile exogenous proteins at low temperatures.

Keywords: promoter, expression system, thermolabile protein

在占地球表面超过 80% 的海洋、极地、冰川、高山等低温环境中广泛分布和生存着大量的低温菌^[1,2], 它们在长期的进化过程中, 建立了能够适应冷环境的生长机制, 依赖于独特的低温启动子, 其 RNA 聚合酶即使在 0 也能进行基因的高效转录, 保持菌体在低温下的正常生长和繁殖^[3], 这种有别于常温菌和高温菌的生命活动现象, 其独特性值得人们加倍重视。

转录是生物体最重要的生命活动过程, 启动子作为基因转录与调控中的核心元件, 直接影响生物

体性状的形成及其对外界环境的适应性^[4]。一些重要的低温酶及功能性低温蛋白基因在常温下启动子无法正常转录, 或者即使有转录表达, 也可能因低温蛋白的热稳定性差、常温下不正确折叠而失活^[5], 一些外源表达后无法正确折叠, 易形成包涵体或产生沉淀^[6], 影响蛋白的产率和活性, 因此分离能在低温下高效启动低温及特殊功能蛋白转录的启动子显得尤为重要。一些很难表达的蛋白通过常温宿主菌在一定的低温下培养实现了表达, 但常温宿主菌

Received: June 29, 2007; Accepted: August 21, 2007

Supported by: the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

Corresponding author: Yunlin Wei. Tel: +86-871-3801018-205; Fax: +86-871-3801191; E-mail: weiyunlin@yahoo.com.cn

教育部留学回国人员科研启动基金资助。

的生理特征决定了它在低温下生长的限度, 所以要找到常温蛋白表达系统在低温下表达有活性的目的蛋白的最佳温度条件也并非易事, 而蛋白的低温表达能很大程度减少包涵体的形成, 增加表达蛋白的可溶性、折叠的正确性和蛋白的活性^[7], 因此构建以低温菌为宿主细胞的低温蛋白表达系统成为解决以上问题的有效方法。

鉴于大多数低温酶在当前的常温菌蛋白表达系统中难以高效表达, 构建以低温菌为宿主的低温蛋白表达系统显得尤为重要, 本研究从低温菌中筛选出低温强启动子, 构建了适于热不稳定蛋白质高效表达的低温外源蛋白表达系统。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株

Acinetobacter sp. DWC6 菌株分离自冻土, 作为启动子探针质粒及异源基因表达的宿主细胞; *Acinetobacter* sp. ATCC9957 为中温菌对照, 由 ATCC 提供(Manassas, VA, USA), 培养温度为 37 °C; *Shewanella* sp. MY8688 菌株分离自高原冰川; *Escherichia coli* JM109 作为扩增质粒的宿主菌; *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS 作为重组蛋白产生的宿主菌。

1.2 质粒

本研究所用质粒见表 1。

表 1 本研究所用质粒列表
Table 1 Plasmids used in the study

Plasmid	Size	Markers	Genetic features	Source
pBAE1	5.7 kb	Ap, Tc	pBR322 derivative with ori of <i>Acinetobacter</i>	This work
pBAPT	4.7 kb	Km	pBR322 derivative lacking the promoter of the β -lactamase gene	This work
pBAP1	6.0 kb	Km	pBAPT derivative with ori of <i>Acinetobacter</i>	Reference 8
pP1	6.2 kb	Km, Ap	pBAP1 derivative with Promoter 1	This work
pP3	6.5 kb	Km, Ap	pBAP1 derivative with Promoter 3	This work
pP6	6.2 kb	Km, Ap	pBAP1 derivative with Promoter 6	This work

1.3 方法

1.3.1 *Acinetobacter* sp. DWC6 的生长特性

将菌株接种到 LB 液体培养基中, 置于不同温度下(4°C~37°C)培养, 通过在线测定 OD_{660} (Bio-photorecorder, Advanlet, Japan)监控菌株生长情况。

在菌体指数生长期时, 以时间为横坐标, OD_{660} 半对数值为纵坐标, 通过线性回归分析测定倍增时间。

1.3.2 启动子的分离及核酸序列测定

启动子的分离参考文献[8], 以双链质粒 DNA 为模板, 采用 ABI PRISM BigDye 终止测序法(Perkin-Elmer, USA), 利用 DNA 自动测序仪(ABI 310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer)进行测序。运用 BDGP(Berkeley drosophilae genome project) 数据库(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)中的 Neural Network Promoter Prediction 软件预测启动子序列。启动子区域测序引物为: AcpS-Kan (5'-AAGCGGCCGGAACAACC-3')和 AcpS-Lac(5'-AAAGGAATAAGGGCG-3')。

1.3.3 N-末端氨基酸序列分析

利用 14.5%的分离胶, 通过 SDS-PAGE 分离浓缩的细胞外蛋白(16 μ g), 利用半干转膜仪(Bio-Rad)将胶中的蛋白电印迹于 Immobilon-PSQ (Millipore) 的 PVDF 膜上。用 0.1%的考马斯亮蓝 R-250 染色, 10%醋酸和 50%甲醇脱色。从膜上切下染色的条带, 利用蛋白质测序仪 PPSQ-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 进行 N-末端氨基酸分析。

1.3.4 RNA 的分离及引物延伸分析

Acinetobacter sp. DWC6 在 18 °C 培养至半对数生长期($A_{660}=0.5$), 用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany)抽提总 RNA。利用荧光标记的寡核苷酸和 DNA 自动测序仪(ABI 377)进行引物延伸分析, 具体方法见《分子克隆实验指南》(1989), 荧光标记的引物为: 5'-AAAGGGAATAAGGGCGACACGG-3', 退火至编码 β -半乳糖苷酶基因的 N-末端区域。反应体系为: 500 μ mol/L dNTPs, 25 u RNase 抑制剂, 5 μ g 模板 RNA, 1 μ mol/L 标记引物和 Omnicript RTase (QIAGEN, Germany)。程序如下: 65°C, 10 min; 42°C, 1 h。引物延伸完毕后, 用 CTAB 沉淀 cDNA, 真空干燥, 用 6 μ L ABI 上样缓冲液悬浮沉淀。热变性后, 样品上样于 5%聚丙烯酰胺测序胶。同时, 以未经荧光标记的引物和含有启动子区域的双链 DNA 质粒作为测序反应的平行对照。通过比较引物延伸反应获得的 DNA 位置和测序反应获得的 DNA 位置, 确定转录起始位点。

1.3.5 构建启动子缺失突变体

为了确定启动子活性区域, 构建了包含截短的

启动子部分的各种缺失突变体。以质粒 pP1、pP3 和 pP6 作为模板, 分别以 P1-F1&PRPVUI2, P1-F2&PRPVUI2, P3-F1&PRPVUI2, P3-F2&PRPVUI2, P3-F3&PRPVUI2, P6-F1&PRPVUI2 和 P6-F2&PRPVUI2 为引物(序列见表 2), 通过 PCR 构建一系列缺失突变体: P1-1, P1-2, P3-1, P3-2, P3-3, P6-1 和 P6-2。引物均含有 *Sma* I 和 *Pvu* I 位点, 便于扩增序列插入 pBAP1。目的片段经 PCR 扩增、限制性内切酶消化、与经 *Sma* I 和 *Pvu* I 酶切的 pBAP1 连接。连接产物通过电穿孔法转化到 *E. coli* JM109 后, 分离质粒并测序。测序正确的质粒通过电穿孔法转化 *Acinetobacter* sp. DWC6, 并检测缺失突变体的 β -半乳糖苷酶活性。

表 2 构建缺失突变体所用引物
Table 2 Primers used for the deletion mutants

Primer	Sequence
P1-F1	TCTATATCCC CGGG TAAATTCTAAACAGAATTGAA
P1-F2	TCTATATCCC CGGGA ATTTAGAACCATCGCCCAGCG
P3-F1	TCTATATCCC CGGGT TTTAAATGCCAGCACGGTGTA
P3-F2	TCTATATCCC CGGGT TAATATGAACACTAGTAGCCAT
P3-F3	TCTATATCCC CGGGG CGCCGTTATTCGGCTAATT
P6-F1	TCTATATCCC CGGG AATAATTATCCTTGCTAAACGT
P6-F2	TCTATCCC CGGG GATGAGAAATCCCTATCAACGT
PRPVUI2	TCCTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGG

1.3.6 实时 RT-PCR 测定启动子转录活性

Acinetobacter sp. DWC6 重组体培养至对数生长后期, 收集 1.5 mL 菌液, 用 RNeasy (QIAGEN, Germany) 纯化总 RNA。加入 2.5 u RNase-free DNase (QIAGEN, Germany) 和 20 u 核糖核酸酶抑制剂 (TaKaRa, Japan), 室温下温浴 2 h, 去除残余的 DNA, 然后 95°C 灭活 15 min。通过分光光度计定量总 RNA, 并以 200 ng 总 RNA 为模板, 根据 *Acinetobacter* sp. DWC6 的 16 S rRNA 序列设计引物: 16SF (5'-GAGC GCGGACGGGTGAGTA-3') 和 16SR (5'-GAGTT AGCCGGTCTTCTT CTGTA-3'), 通过 RT-PCR 对 16 S rRNA 进行定量。 β -半乳糖苷酶基因转录产物的定量引物为 Lac-RTF (5'-ACTGCGGCAACTTACT TCTGACA-3') 和 Lac-RTR (5'-CTACGATACGGGA GGGCTTACCAT-3')。

实时 RT-PCRs 利用 QuantiTect™ SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) 在 96 孔板上进行,

反应体系为 50 μ L: 25 μ L SYBR Green PCR 混合物, 0.5 μ L RT 混和物和各 1 μ mol/L 引物。反应程序如下: RT 反应 50°C, 30 min; 95°C 热启动 15 min; 94°C 15 s, 54°C 30 s, 72°C 30s, 35 个循环。通过测定荧光对反应循环的增量及定位曲线的半对数期开始基线获得 Ct, 利用 iQ Optical System Software Ver.3.0A (Bio-Rad) 进行数据分析。稀释标准的 pUC118 质粒 DNA 获得 0.001 pg 到 10 ng 的 DNA 标准品。假定 1 pg pUC118 对应 3.5×10^5 分子, 一个质粒代表一种基因, 那么, 通过阳性对照标准品的浓度即可计算出基因拷贝数。

1.3.7 α -淀粉酶表达载体的构建

利用 iCycler thermal cycler (Bio-Rad), *Shewanella* 属 α -淀粉酶基因的通用引物, 通过 PCR 扩增 *Shewanella* sp. MY8688 菌株的 α -淀粉酶基因。PCR 缓冲液含有 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 8 mmol/L MgCl₂, 7.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L MgSO₄, 各 0.2 mmol/L dNTPs 和 1 u KOD DNA 聚合酶 (Toyobo, Japan)。反应程序为: 94°C 热变性 5 min; 94°C 15 s, 60°C 30 s, 68°C 1 min, 30 个循环; 68°C 15 min。PCR 产物与 pCR-Blunt II (Invitrogen, USA) 连接, 电转化 *E. coli* Topo10 (Invitrogen, USA)。通过核酸测序及 PCR 扩增验证含 α -淀粉酶基因的重组体。从质粒中分离编码 α -淀粉酶的 DNA 片段, 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Pvu* I 消化, 并连接到经 *Hind* III 和 *Pvu* I 消化的 pP3 质粒上, 成功构建 pP3-amy 载体, 并转化 *Acinetobacter* sp. DWC6。转化子在含有 40 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 15°C 和 7°C 培养。静止期收集细胞并离心, 超声破碎细胞沉淀, 离心去除细胞碎片, 测定培养基中和细胞提取物中 α -淀粉酶活性。

利用 pCRT7/CT-TOPO (Invitrogen, USA) 构建质粒 pCRT7-amy, 其能在 *E. coli* 中产生 α -淀粉酶。利用 KOD DNA 聚合酶, PCR 扩增 α -淀粉酶基因。用 *rTaq* DNA 聚合酶 72 处理 PCR 产物 15 min, 在 5'-末端加 A, 然后与 pCRT7/CT-TOPO 连接, 构建 pCRT7-amy 质粒, 并电转化 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS。转化子在含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中 37°C 和 18°C 培养。当培养基 A₆₀₀ 值达到 0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG。静止期收集细胞, 超声破碎细胞沉淀, 测定培养基中和细胞提取

物中 α -淀粉酶活性。

1.3.8 淀粉降解活性的测定及 α -淀粉酶检测

利用平板影印法将所有 *E. coli* 和 *Acinetobacter* sp. DWC6 的重组体转至含有 1% 可溶性淀粉和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp(*E. coli*) 或 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan (*Acinetobacter* sp. DWC6) 的 LB 固体平板上, 37°C 和 15°C 培养 1~3 d。通过升华碘(Nacalai chemicals, Japan)检测水解淀粉的菌落, 培养基中的淀粉染成黑蓝色, 而具有淀粉酶活性的菌落在其周围则产生无色的晕轮。

利用 α -淀粉酶 HR 试剂(Megazyme international Ireland Ltd., Ireland)测定 α -淀粉酶活性。酶液在非还原末端封闭的 *p*-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7)及过量热稳定性的 α -葡(萄)糖苷酶条件下培养。通过内部作用于 α -淀粉酶水解低聚糖, 混合物中过量的 α -葡(萄)糖苷酶迅速及定量地催化 BPNPG7 水解为葡萄糖和游离的 *p*-nitrophenyl, 通过测定 A_{400} [摩系数因子 18100 L/(mol·cm)]得到游离的 *p*-nitrophenol。以 1 min 内催化生成 1 μmol 产物所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.3.9 α -淀粉酶在 *Acinetobacter* sp. DWC6 中的大量表达

带有 pP3-amy 的 *Acinetobacter* sp. DWC6 转化子在终浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 液体培养基中, 7°C 培养 48 h 后, 4°C, 4500 g 离心 1 h, 收集培养上清液并通过 Amicon MWCO 30000 (Millipore, USA) 超滤浓缩培养液中的分泌蛋白 150 倍, 每个泳道上样 20 μL 浓缩样品(约含 16 μg 蛋白), 进行 SDS-PAGE 分析。利用 NIH image software (1.62 version)定量分析 α -淀粉酶表达量。

2 结果

2.1 不同温度下菌体生长情况

Acinetobacter sp. DWC6 能在 4~32°C 之间生长, 在 4°C 培养时的倍增时间为 7.3 h, 且在 4°C 培养 30 min, OD_{600} 值达到 5 左右, *Acinetobacter* sp. ATCC9957 不能在 4°C 生长(见表 3), 在 4~15°C 时, *Acinetobacter* sp. DWC6 生长速度明显快于 *Acinetobacter* sp. ATCC9957。在 20°C 时, 二者倍增时间基本相同, 在 37°C 时, *Acinetobacter* sp. DWC6 不能生长。

表 3 两株 *Acinetobacter* 菌株生长温度与倍增时间的关系
Table 3 Growth rates of *Acinetobacter* strains

Growth temperature/°C	Doubling time/h	
	Strain DWC6	Strain ATCC9957
4	7.3	No growth
8	3.9	6.1
15	2.4	3.1
20	2.1	2.4
25	2.0	1.4
28	1.4	1.2
30	1.3	1.1
37	No growth	1.0

2.2 启动子核酸序列的测定

带有启动子活性的 6 个质粒在 *E. coli* 中增殖、分离, 并测序。将 6 个质粒分为 3 组(图 1), 分别命名为 pP1、pP3 和 pP6, 相应的插入片段为 P1、P3 和 P6。P1 和 P3 由限制性内切酶 *Sau3A* I 酶切 *Acinetobacter* sp. DWC6 染色体 DNA 获得, 而 P6 由限制性内切酶 *Alu* I 酶切染色体 DNA 得到。插入片段 P1、P3 和 P6 的大小分别为 174、445 和 164 bp(图 1)。利用 BDGP 软件预测潜在的启动子序列。基于预测结果, 构建了一系列截短的质粒, 并测定了带有这些质粒转化子的 β -lactamase 活性(活性测定方法参见文献[8])。P1 Δ 1 和 P1 Δ 2 分别失去约 70% 和 100% 的原始活性(图 2); P3 Δ 1 保留原始活性, 而 P3 Δ 2 和 P3 Δ 3 分别失去约 50% 和 100% 原始活性(图 2); P6 Δ 1 保留原始活性, 而 P6 Δ 2 则根本没有启动子活性(图 2)。

2.3 转录起始位点的确定

利用与 β -lactamase 基因 5'-区域互补、且荧光标记的寡核苷酸引物, 通过引物延伸实验确定转录起始位点, P1、P3 各有 2 个延伸产物, 而 P6 只有 1 个(图 3)。对比原有序列, 确定了转录起始位点: P1 有两个起始位点分别是-105 位的 A 和-106 位的 G (A105 和 G106); P3 也有两个起始位点, 分别位于-246 的 A 和-397 位的 T(A246 和 T397); P6 只有一个起始位点位于-112 的 C (C112)(图 1)。这些启动子的起始位点上游区域均存在潜在的-35 和-10 区域: XXTAXT 位于-10 区, AXAAXT 位于-35 区(图 1)。

2.4 定量 RT-PCR 确定启动子活性

利用 QuantiTectTM SYBR Green RT-PCR Kit 进行实时 RT-PCR。实验表明: 用 DNase I 处理 RNA

P1:

```

1 GATCACAGTT TTGACTGGAA AGATAAATAT TTTGTAAAAC ATCGGCCAAG
51 TTAAATTCTA AACAGAATTG AAATTGGCG CTAAAACCGC TATATTATAG
101 GATGAGCTAT TGTCGGAAA TAAAACCTTT TATGAATTTA GAACCATCGC
151 CCAGCGCTTC TAATTCTCTC GATC
    
```

P3:

```

1 GATCAATCTT TAAAATTTTA TCTAAAGTCT CTGAGGCCAG CTCATATTCA
51 TGGGCTTTTA AGGCAATATG CGATAGATAA AATAAAGCTG GTACATCGGT
101 GGGTCTTGC ACCACCCAAT GGGTGGCAAT ATCGAGCGCC GCTTTTAAGT
151 CATTGTGTTT TAAGGCAATA TTGAGTGC GCCTGCTGAC CATGGTGGAG
201 TTGCTTTTAA TTGCCAGCAC GGTGTAGTTG TGTAATGCTG TAGCAACATC
251 ATGGTTGGTC AGGGCAAATT CTGCGACCAT GCTTTGCTGT ATAGCATTAT
301 AGTTTGAATT GGCATGGTAA ATATCTCCAG ATGCTCTAAT ATGAACACTA
351 GTAGCCATGC TCCCAAGTAAGAATGTG GTAGAATATT GCTTAATTGT
401 CGCGCGCTT ATTCGGCTAT TTGTTGACG CAATTTTCT TGATC
    
```

P6:

```

1 CTCAGTTGGT AGAGCGTCTG CCTTACAAGC AGAATGTCGG CGGTTTCGATC
51 CCGTCAGCGC CCACCATAAT TATCCTTGCT CAAACGTAT TTTTTCATA
101 AACTCTCAAA ACTATAATAA TTTTAAAGAT TGAGACGTGA TGAGAAATCC
151 CTATCAACGT AAAG
    
```

图 1 分离到的启动子核酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of the isolated promoters

Transcriptional initiation sites are indicated in bold characters with arrows

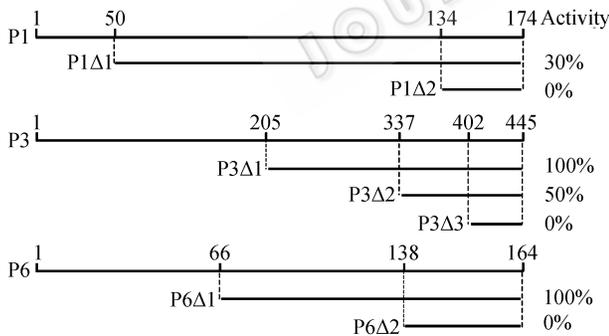


图 2 启动子缺失突变体构建策略图

Fig. 2 Schematic diagram of construction of the promoter-deletion mutants

β -lactamase activities are shown at the right

对于避免质粒 DNA 的污染非常有效; *Acinetobacter* sp. DWC6 在不同温度下培养, 16 S rRNA 均持续表达, 这表明 16 S rRNA 是定量 RT-PCR 中输入 RNA 的理想内参(表 4)。稀释标准的 pUC118 质粒 DNA 获得 0.001 pg 到 10 ng 的 DNA 标准品。假定 1 pg pUC118 对应 3.5×10^5 分子, 一个质粒代表一种基因, 那么, 通过阳性对照标准品的浓度即可计算出基因拷贝

数。当 β -lactamase 基因位于 P3 启动子下游时, 高效转录, 且 P3 启动子的活性比 β -lactamase 基因固有的启动子活性高出 10 多倍(表 5)。

表 4 *Acinetobacter* sp. DWC6 重组体在不同温度下 16S rRNA 的量

Table 4 Quantification of 16S rRNA of recombinant *Acinetobacter* sp. DWC6 grown at various temperatures

Recombinants	Threshold Cycle (C_t)		
	7	15	25
pP1	17.28	17.22	17.32
pP3	17.17	17.23	17.45
pP6	17.38	17.34	17.45
pBAP1	17.28	17.14	17.24
pBAE1	17.13	16.97	16.85

2.5 *Shewanella* sp. MY8688 的 α -淀粉酶在 *Acinetobacter* sp. DWC6 中的高效表达

Shewanella sp. MY8688 的 α -淀粉酶不能在 *E. coli* 表达系统中大量表达(图 4)。不仅 *Shewanella* sp. MY8688 的 α -淀粉酶, 而且其蛋白酶、脂肪酶也不能

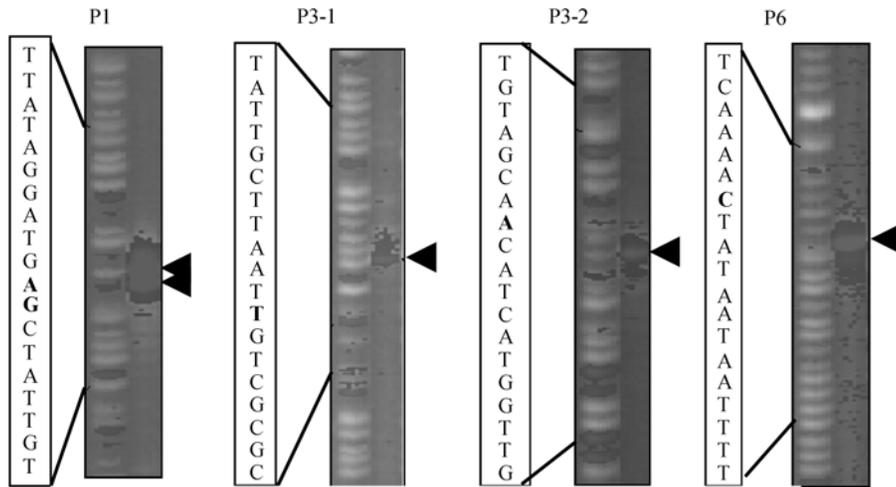


图 3 启动子引物延伸分析

Fig. 3 Primer extension analysis of the promoters.

The transcription initiation sites are indicated in bold characters. The primer extension products are indicated by arrowheads

表 5 *Acinetobacter* sp. DWC6 重组体 β -lactamase mRNA 的量

Table 5 Quantification of the β -lactamase mRNA from recombinant *Acinetobacter* sp. DWC6 harboring various plasmids

Recombinants	Copy number		
	16S RNA	Lac mRNA	Fold
pP1	3.75×10^6	4.71×10^6	3.9
pP3	3.94×10^6	1.22×10^7	10
pP6	4.00×10^6	2.77×10^6	2.3
pBAP1	4.01×10^6	4.91×10^5	0.4
pBAE1	3.89×10^6	1.21×10^6	1

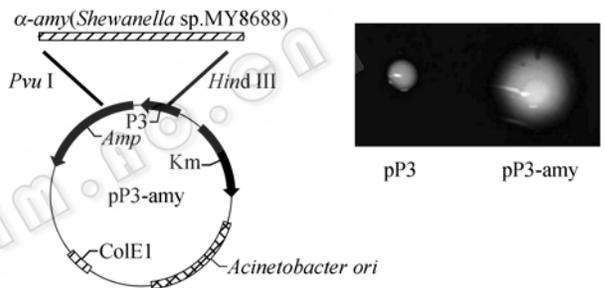


图 5 pP3-amy 表达质粒构建图及 *Acinetobacter* sp. DWC6 重组体产生的 α -淀粉酶

Fig. 5 Construction of an expression plasmid, pP3-amy, and production of α -amylase by the recombinant *Acinetobacter* sp. DWC6

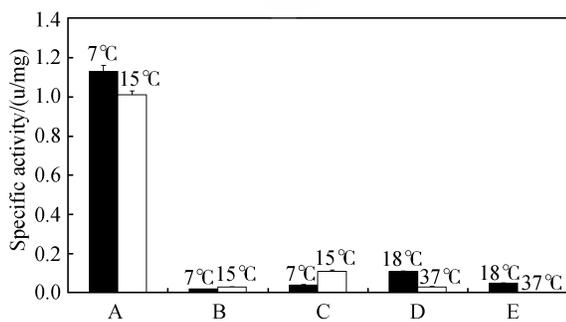


图 4 不同温度下胞外 α -淀粉酶活性

Fig. 4 α -Amylase activity in the extracellular fractions after cultivation of bacteria at various temperatures

A: *Acinetobacter* sp. DWC6 with pP3-amy; B: *Acinetobacter* sp. DWC6 with pP3; C: *Shewanella* sp. MY8688; D: *E. coli* BL21 (DE3) pLys with pCRT7-amy; E: *E. coli* BL21 (DE3) pLys with pCRT7/CT-TOPO

在 *E. coli* 表达系统中大量表达(数据未显示)。成功构建表达质粒 pP3-amy 后(图 5), 在低温条件下, *Shewanella* sp. MY8688 的 α -淀粉酶能在 *Acinetobacter*

sp. DWC6 中大量表达; 而大肠杆菌在低温下有极少量表达, 在大肠杆菌最适生长温度 37°C 时几乎没有表达。利用 α -淀粉酶 HR 试剂(Megazyme international Ireland Ltd., Ireland)测定 α -淀粉酶活性, 通过测定 A_{400} [摩系数因子 18 100 L/(mol · cm)]得到游离的 *p*-nitrophenol。以 1 min 内催化生成 1 μ mol 产物所需的酶量定义为一个酶活单位。7°C 培养时, 细胞外 α -淀粉酶活性最高, 达到 1.17 u/mg(图 5)。利用半干转膜仪(Bio-Rad)将胶中的蛋白电印迹于 Immobilon-PSQ (Millipore) 的 PVDF 膜上。从膜上切下染色的条带, 利用蛋白质测序仪 PPSQ-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan)进行 N-末端氨基酸分析。SDS-PAGE 和 N-末端氨基酸测序进一步证实了 α -淀粉酶的高效表达, 表达量达到细胞外总蛋白的 35%(图 6)。进一步的实验表明该 α -淀粉酶粗酶液的最适反应温度为 28°C, 在 4°C 时酶反应速度为最适反应温度的 50%, 该粗

酶液在 37°C 保温 1 h 后即失活; 蛋白分子量约为 67 017.65 D, pI 值为 4.53; 经 Blastp (Ver. 2.2.17) 蛋白比对, 发现与 *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 的 α -淀粉酶的催化区域蛋白相似度最高, 达到 99%; 该酶为 Ca^{2+} 依赖型; 定位于细胞外膜。这些结果显示: 本研究建立的表达系统对于低温下热不稳定异源蛋白质的高效表达是非常有用的。

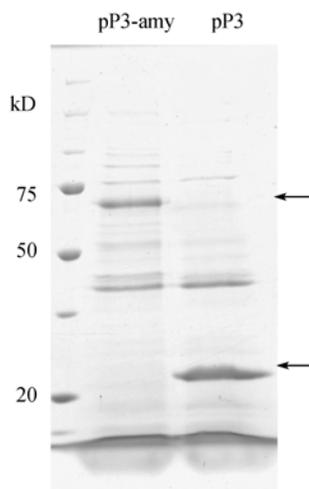


图 6 重组表达载体 α -淀粉酶 SDS-PAGE 分析
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of α -amylase of *Shewanella* sp. MY8688 produced by *Acinetobacter* sp. DWC6 harboring pP3-amy
 α -amylase band is indicated by an arrowhead on the top,
 β -lactamase band is indicated by an arrowhead at the bottom

3 讨论

启动子是基因表达调控的重要元件和蛋白表达载体质粒的重要组成部分, 因此分离出具有高效启动功能的启动子成为基因工程研究不可缺少的工作^[9,10]。

低温启动子的研究属于刚刚起步阶段, 目前仅有 Duilio 等人从分离自南极的海洋低温假交替单胞菌属菌株 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 中, 通过构建文库的方式, 利用启动子探针质粒(以 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 为宿主细胞), 筛选到了能在 4°C 启动转录的低温启动子^[11,12]。对这些启动子的结构和功能的解析, 为我们认识低温启动子在低温下启动的机制提供了生动的材料。

而仅有的另一个有关低温启动子的研究是分离自南极的低温丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的工作。令人惊奇的是, 对其 *hutU* 基因的启动子研

究表明, 其-10 区采用的是独特的富含 A 碱基的 CAAA 序列, 而不是常见的 TATAAT, 而且具备不止一个的转录起始位点, 在 4°C 和 22°C 分别有其独特的转录起始位置, 同时在其转录起始位点和翻译起始位点之间具有一段在常温菌低温诱导型基因中常见的非翻译片段^[13]。

以低温菌为宿主细胞、利用来源于低温菌的启动子构建低温蛋白表达系统最近已有部分报道^[11,14], 研究表明在常温蛋白表达系统所难以表达的蛋白^[12], 包括来源于常温菌的甲苯、二甲苯单加氧酶^[15], 来源于人类的神经生长因子^[16]在这些表达系统中均获得了有效表达。尤其值得关注的是在低温蛋白表达系统表达的神经生长因子不但没有形成包涵体, 而且准确定位于细胞的周质空间, 充分体现了低温蛋白表达系统的优越性, 为异源低温蛋白和常温蛋白的高效表达提供了新的有效方法^[16]。

本研究通过构建启动子探针质粒筛选到高活性的低温启动子 DNA 片段, 通过引物延伸试验, 确定了转录的起始位点和主要调控区, -10 区所具有的 XXTAXT 结构与当前报道的启动子-10 区 TATAAT 既有相似性又有不同, 还存在有多个转录起始位点的现象。在常温表达系统中不能表达的 α -淀粉酶基因在新构建的低温表达质粒中获得了表达。当然, 在此表达系统中也尚存在一些不足, 比如该宿主菌的发酵总生物量不高, 导致目的蛋白的生产总量受到了限制, 今后在宿主菌的选择上尚有许多工作值得探讨。总之, 从我们业已获得的结果来看, 通过构建以低温菌为宿主的低温蛋白表达系统是解决高效、大量生产热不稳定蛋白质的一条可行之路。

致谢: 本研究部分工作在日本京都大学化学研究所完成, 谨向该研究所的江琦信方及栗原教授表示感谢!

REFERENCES

- [1] Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1975, 39(2): 144-167.
- [2] Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(3): 253-261.
- [3] Uma S, Jadhav RS, Kumar GS, et al. A RNA polymerase with transcriptional activity at 0 degrees C from the Antarctic bacterium *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett*, 1999, 453(3): 313-317.

- [4] Cases I, de Lorenzo V. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(5): 105–118.
- [5] Margesin R, Schinner F. Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**(4): 482–486.
- [6] Rosanna Papa, Valentina Rippa, Giovanni Sannia, *et al.* An effective cold inducible expression system developed in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Journal of Biotechnology*, 2007, **127**(2): 199–210.
- [7] Jeon YH, Negishi T, Shirakawa M, *et al.* Solution structure of the activator contact domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Science*, 1995, **270**(5241): 1495–1497.
- [8] Wei YL, Lin LB, Ji XL, *et al.* Construction of promoter probe vector for a cold-adapted bacterium, *Acinetobacter* sp. DWC6(). *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(3): 530–534.
魏云林, 林连兵, 季秀玲, 等. 低温菌启动子探针质粒的构建. *生物工程学报*, 2007, **23**(3): 530–534.
- [9] Sun XH, Chen MJ, Pan YJ. A brief account of promoter cloning. *Acta Edulis Fungi*, 2002, **9**(3): 57–62.
孙晓红, 陈明节, 潘迎捷. 启动子克隆概述. *食用菌学报*, 2002, **9**(3): 57–62.
- [10] Li SS, Chi Y, Li LF, *et al.* Progress on cloning of promoter. *China Biotechnology*, 2005, **25**(7): 9–16.
李姗姗, 迟彦, 李凌飞, 等. 启动子克隆方法研究进展. *中国生物工程杂志*, 2005, **25**(7): 9–16.
- [11] Duilio A, Madonna S, Tutino ML, *et al.* Promoters from a cold-adapted bacterium: definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements. *Extremophiles*, 2004a, **8**(2): 125–132.
- [12] Duilio A, Tutino ML, Marino G, *et al.* Recombinant protein production in antarctic Gram-negative bacteria in recombinant gene expression. *Methods Mol Biol*, 2004b, **267**: 225–237.
- [13] Janiyani KL, Ray MK. Cloning, sequencing, and expression of the cold-inducible hutU gene from the antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 1–10.
- [14] Birolo L, Tutino ML, Fontanella B, *et al.* Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Cloning, expression, properties, and molecular modelling. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(9): 2790–2802.
- [15] Loredana Siani, Rosanna Papa, Alberto Di Donato, *et al.* Recombinant expression of Toluene *o*-Xylene Monooxygenase (ToMO) from *Pseudomonas stutzeri* OX1 in the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Journal of Biotechnology*, 2006, **126**(3): 334–341.
- [16] Ileana Vigentini, Annamaria Merico, Maria Luisa Tutino, *et al.* Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Biotechnology*, 2006, **127**(1): 141–150.

我单位《生物工程学报》等4种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近1年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等4种期刊自第1卷第1期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计130卷620余期, 约1万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。