

# 枯草杆菌碱性蛋白酶基因诱导表达载体的构建

朱欣华 谢 芳 黄 静 邢自力 吴自荣\*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

**摘要:** 以 PCR 方法扩增 *sacB* 基因的启动子-信号肽序列 (称为 *sacR*), 将其与枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶的前肽-成熟酶基因连接后克隆入载体 pUBH, 构建了含碱性蛋白酶基因的分泌型诱导表达载体 pUBS, 将其转化枯草芽孢杆菌 DB403 后, 获得基因工程菌 DB403 (pUBS)。碱性蛋白酶基因在 *sacR* 的调控和蔗糖的诱导下实现了表达分泌, 获得了具生物学活性的碱性蛋白酶。

**关键词:** 诱导表达, 碱性蛋白酶, 枯草芽孢杆菌

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0021-05

## DEVELOPMENT OF AN INDUCIBLE EXPRESSION AND SECRETION SYSTEM FOR ALKALINE PROTEINASE IN *BACILLUS SUBTILIS*

ZHU Xin-Hua XIE Fang HUANG Jing XING Zhi-Li WU Zi-Rong

(East China Normal University Life Science College, Shanghai 200062)

**Abstract:** The regulatory region and the signal peptide sequence of the *sacB* gene has been amplified by PCR using *Bacillus subtilis* chromosomal DNA as template, and an inducible secretion vector has been developed based on this sequence, which was ligated with *Bacillus subtilis* alkaline proteinase gene. Transform *Bacillus subtilis* DB403 with this vector, and the expression of the inserted *Bacillus subtilis* alkaline proteinase gene can be induced by addition of sucrose into the medium.

**Key words:** Inducible expression, Alkaline proteinase, *Bacillus subtilis*

---

\* 联系人 Tel: 021-62233295, E-mail: mbjwu@online.sh.cn

收稿日期: 2002-10-21, 修回日期: 2002-11-29

枯草芽孢杆菌表达系统被认为是一种较为理想的异源蛋白质表达系统,其优点在于可以高效表达具生物学活性的异源蛋白质并将其分泌至培养基中,从而有利于产物的纯化。而缺点在于其自身也会向胞外分泌大量的蛋白酶,使其表达的外源蛋白无法稳定存在<sup>[1]</sup>。构建诱导型的表达分泌载体是克服这个重要途径之一。国内外一些实验室在构建和使用枯草芽孢杆菌蔗糖诱导表达系统方面已经取得了一些成果, Sui-Lam Wong 采用该系统成功的实现了链激酶的高效表达<sup>[2]</sup>; 罗进贤等也以此系统对地衣芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶进行了有效的表达<sup>[3]</sup>。

在本研究中,我们用 PCR 方法扩增获得了 *sacB* 的启动子-信号肽序列(称为 *sacR*),并以此为基础构建了对枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶进行诱导表达的分泌-分泌型载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (supE44,  $\Delta$ lacU169, hsdR17, recA1, thi1gyrA96, endA1, relA1), 枯草芽孢杆菌 DB2, DB403 (tryC2,  $\Delta$ nprE1,  $\Delta$ aprE1,  $\Delta$ eprE1) 由本实验室保藏; 质粒 pGEM-T 购自 Promega 公司; 质粒 pUBH ( $Km^R$ ) 为含枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的分泌分泌型载体质粒, 由本实验室构建。

### 1.2 主要试剂

本实验所用的限制性内切酶均为 MBI 公司产品; T4 连接酶、EX Taq 酶、DNA 分子量标准为 Takara 公司产品; DNA 胶回收试剂盒为维特洁公司产品; 所有引物均由博彩公司合成。

### 1.3 DNA 的提取与操作

枯草芽孢杆菌染色体、质粒 DNA 的提取纯化、酶切、连接及转化采用 Lin-Fa Wang 的方法<sup>[4]</sup>; 大肠杆菌质粒的提取、酶切、转化按 Sambrook 的方法<sup>[5]</sup>。

### 1.4 基因的 PCR 扩增及产物的纯化

基因的 PCR 扩增按照 Takara 公司的 Ex Taq 酶的说明书进行, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 胶回收试剂盒回收。

### 1.5 TA 克隆

按照 Promega 公司 pGEM-T 载体试剂盒的说明书进行。

### 1.6 基因序列的测定

由博亚生物技术公司完成。

### 1.7 枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶活性的测定

按照 Deogny 等人的纤维平板法进行<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 *sacB* 基因启动子及信号肽序列 (*sacR*) 的克隆

2.1.1 PCR 扩增引物的设计: 根据已发表的 *sacB* 基因的全序列<sup>[7]</sup>, 设计用于扩增 *sacR* 的两个引物如下:

*sacBam*HI: 5'-CGGGATCCATCACATATACCTGCCGT-3'  
(5'端) *Bam*HI

*sacXho*I: 5'-GCGAATTCACCTCGAGCGCAAACGCTTGAGTTGC-3'  
(3'端) *Eco*RI *Xho*I

引物设计原则如下: (1) 在 5' 端上游加入 *Bam*HI 位点, 使其可以连入载体, 在 3' 端下游加入 *Xho*I 位点, 连接碱性蛋白酶前肽的编码序列, *Eco*RI 位点用于连接其他的基因; (2) 不破坏碱性蛋白酶基因的阅读框。

为扩增碱性蛋白酶的成熟酶及前肽基因, 设计了两个引物:

sac-AT-x: 5'-GCAGGCTCGAGGCCGGAAGCACTACAG-3'

(5' 端) *Xho*I

NK3': 5'-AGAGAATTCGCCGGAACATCAGGATGC-3'

(3' 端) *Eco*RI

在其序列的 5' 端引入 *Xho*I 位点, 连接 *sacR* 中的信号肽序列。

**2.1.2** *sacR* 的 PCR 扩增及产物序列分析: 以枯草芽孢杆菌 DB2 染色体 DNA 为模板, 使用引物 *sac Bam*HI 和 *sac Xho*I 经 28 个循环的 PCR 反应获得 *sacR* 序列, 经电泳显示为单一的条带 (见图 2 的电泳条带 1), 大小约为 560bp 左右, 经测序证明其与已发表的 *sacB* 基因从 17 到 551bp 处的序列完全相同, 包括 *sacB* 启动子、200bp 的类转录中止信号序列、SD 序列及编码 29 个氨基酸的信号肽序列, 长 557bp, 其序列如下。

*Bam*HI

CGGGATCCATCACATATACCTGCCGTTCACTATTATTTAGTGAATGAGATATT  
ATGATATTTTCTGAATTGTGATTAAGGCAACTTTATGCCCATGCAACAGA  
AACTATAAAAAATACAGAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTAGTTCTTT  
AGGCCCCGTAGTCTGCAAATCCTTTTATGATTTTCTATCAAAACAAAGAGGAAA  
ATAGACCAGTTGCAATCCAAACGAGACTCTAATAGAATGAGGTGCAAAAGTAA  
ATCGCGCGGGTTTGTTACTGATAAAGCAGGCAAGCAATAAAATGTGTAAAGGG  
CAAAGTGTATACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTTATTG  
TGCCTAACTAACTTGCCATCTTCAAACAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCT  
AACACAGTACATAAAAAAGGAGACATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAA  
AACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCAGGAGGCGCAACT  
CAAGCGTTTGCCTCGAGTGAATTCCG

*Xho*I *Eco*RI

## 2.2 诱导型表达分泌载体 pUBS 的构建

以质粒 pUBH 为模板, 使用引物 sac-AT-x 和 NK3', PCR 扩增出碱性蛋白酶的前肽及成熟酶基因 (简称为 *pro-AT*), 经电泳确证获得了 1,145bps 长的基因片段 *pro-AT* (见图 2 的电泳条带 2)。将其用 *Xho*I 酶切后与同样用 *Xho*I 酶切的 *sacR* 连接, 然后以之作为模板, 以 *sac Bam*HI (5' 端) 和 NK3' (3' 端) 作为引物, 用 PCR 的方法扩增出基因序列 *sacR-AT*。经电泳鉴定, 其长度约为 1.7kbps (见图 2 的电泳条带 3), 将该片段克隆入 pGEM-T 载体中。

以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切含 *sacR-AT* 的 pGEM-T 载体, 纯化出基因片段, 同时也用这两种酶双切质粒 pUBH, 胶回收含复制起点和卡那抗性基因的大片段 (长约 3.7kbps)。将两段基因连接, 以连接产物转化 DB403, 筛选卡那霉素抗性转化子。转化子质粒经 PCR 和酶切鉴定后 (见图 2 的条带 5, 6), 确证获得了含 *sacR-AT* 的重组质粒, 命名为 pUBS (克隆过程见图 1 所示)。

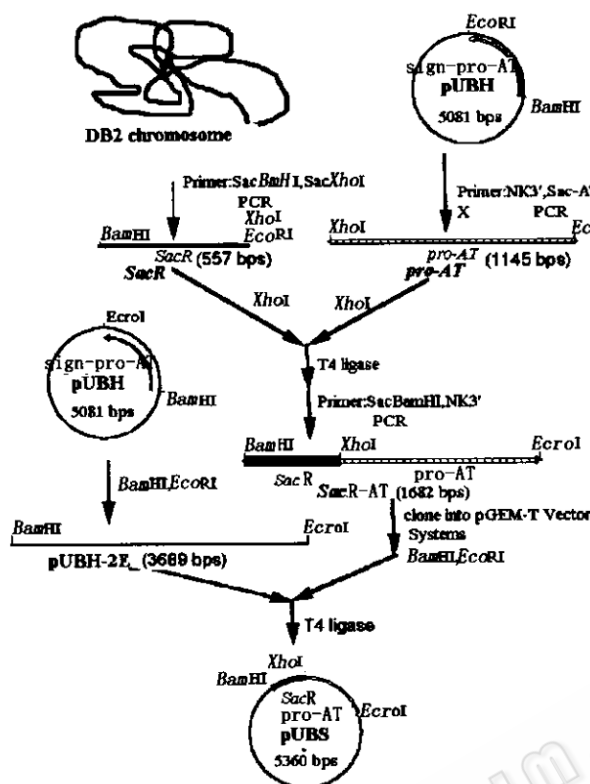


图1 诱导表达分泌载体 pUBS 的构建过程

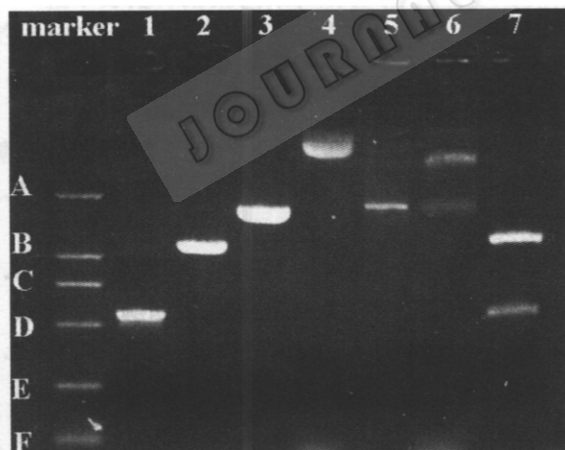


图2 pUBS 构建过程中各基因片段及重组质粒鉴定的凝胶电泳图谱

DNA marker 中 A, B, C, D, E, F 各条带分别代表 2,000bp, 1,000bp, 750bp, 500bp, 200bp, 100bp; 1 *sacR* 的 PCR 产物, 2 *pro-AT* 的 PCR 产物, 3 *sacR-AT* PCR 扩增产物, 4 pUBS 质粒, 5 从 pUBS 上以 PCR 方法扩增出的 *sacR-AT*, 6 *Bam*HI + *Eco*RI 双酶切 pUBS, 7 *Xho*I 酶切从 pUBS 上以 PCR 方法扩增出的 *sacR-AT*

## 2.3 枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶的蔗糖诱导表达

为了确证质粒 pUBS 中 *sacB* 信号肽的编码序列与枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶前肽的编码序列之间的阅读框连接正确, 我们测定了整个 *sacR-AT* 基因序列, 结果证明两者融合正确 (序列从略)。

挑取转化子单菌落接种于 1mL LB 培养基, 37℃ 振荡培养过夜, 1/20 体积比接种于两个装 LB 培养基中锥形瓶中, 37℃ 振荡培养。接种 2h 后向其中一瓶中加入蔗糖溶液使其终浓度达到 2% (W/V)。此后定时取样, 测定菌液密度  $OD_{660}$  (发酵液稀释 4 倍) 值, 离心取上清液, 测定酶活性。结果如图 3 所示。在加入蔗糖后, 碱性蛋白酶立即开始诱导表达, 诱导

1h 后发酵液中的酶活是对照的 9 倍, 至 10h 达到 11 倍。这表明碱性蛋白酶在 *sacR* 的调控下实现了蔗糖诱导表达, 其产物被成功的分泌到胞外。

使用该菌种进行长时间发酵 (48h), 对比发酵液中的碱性蛋白酶活性及菌密度, 见图 4。从图中可以看出, 在发酵过程中, 经蔗糖诱导之后, 该菌持续生长, 持续分泌碱性蛋白酶, 其生长态势与其分泌酶的量基本一致; 而不加蔗糖时, 该菌在发酵约 10h 菌密度达到最高, 其后菌密度则持续下降, 酶的分泌量也很低。这似乎很不符合一般细菌的发酵规律, 其原因有待于以后进一步试验研究解释。

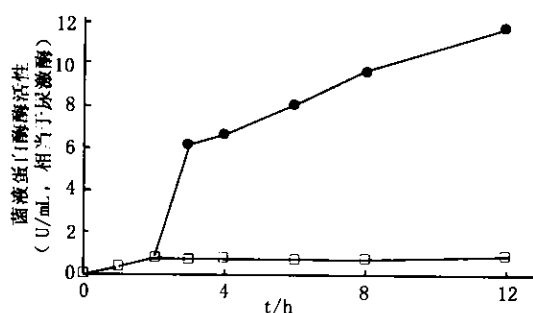


图3 碱性蛋白酶的蔗糖诱导表达

—●— 诱导组酶活性, —□— 对照组酶活性

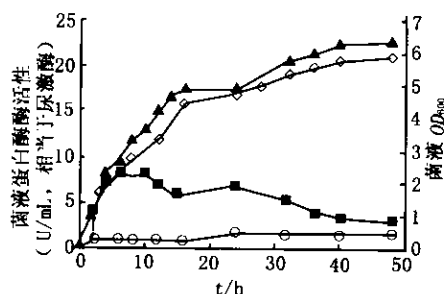


图4 pUBS的发酵过程

—◇— 诱导组酶活性, —○— 对照组酶活性  
—▲— 诱导组菌密度, —■— 对照组菌密度

### 3 试验讨论

在枯草芽孢杆菌表达系统中使用诱导启动子系统有两个好处：(1) 在加入诱导剂之前外源基因并不表达，不影响宿主菌的生长，也有利于外源基因在宿主菌中的稳定存在；(2) 适当选择诱导剂加入的时机，就可以控制外源蛋白表达的时间，从而抢在枯草芽孢杆菌分泌蛋白酶之前结束发酵（大多数枯草杆菌蛋白酶均在稳定期表达），保证外源蛋白的稳定和高产量。

在枯草芽孢杆菌中，有两种在生化和遗传水平上都阐述得较为清楚的诱导体系可以使用：葡萄糖诱导系统和蔗糖诱导系统。蔗糖诱导系统中一个可诱导表达的基因：*sacB*，编码了一种外分泌的蔗糖果聚糖酶<sup>[7]</sup>，该基因既具有蔗糖诱导表达所需要的诱导区域，也具有使蛋白有效分泌的信号肽序列，而且有很多可以促进其表达的调控子系统，如 *degU*, *priR*, *degQ*<sup>[8]</sup> 等，可以使 *sacB* 基因的表达增加 10 ~ 100 倍。如在 Sui-Lam Wong 的试验中，在载体中插入 *degQ* 基因提高了靶基因表达量 17 倍，而使用 *degU* (Hy) 型的宿主菌则使表达量提高了 24 倍<sup>[9]</sup>。

在本研究中，以 PCR 的方法扩增获得了枯草芽孢杆菌 DB2 上的 *sacB* 基因的启动子及信号肽序列 (*sacR*)，并以枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶作为靶基因构建了诱导型的表达分泌载体，证明在 *sacR* 的作用下，实现了碱性蛋白酶基因的蔗糖诱导表达，为以后在枯草杆菌中诱导表达外源基因打下了基础。靶基因选取较方便测定的碱性蛋白酶，有利于在进一步的完善该系统时测定其效率和表达特征。

在本试验中，由于 *sacR* 启动子本身的效率不高，所以靶基因的表达分泌量并不是很高。但可以预期，在通过改变各调控基因的表达，优化该诱导表达系统之后，本系统在表达其他异源基因上会有较好的表现。

### 参考文献

- [1] 邓兵兵, 熊凌霜. 生物工程进展, 2000, 20 (1): 62 ~ 66.
- [2] Ruiqiong Y, June-hyung K, Sui L W. Biotech and Bioengineering, 1999, 62 (1): 87 ~ 95.
- [3] 吴青, 罗进贤, 徐柏年, 等. 微生物学报, 1997, 37 (2): 101 ~ 106.
- [4] Roy H D, Martina M. Biology of Bacilli: Applications to Industry. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. 353 ~ 358.
- [5] Sambrook J, David W, Russell. Mol Cloning 2nd ed. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- [6] Deogny L, Weidenbach A, Hampton J W. Chin Chim Acta, 1975, 60: 85 ~ 89.
- [7] Michel S, Dominique L C. Mol Gen Genet, 1985, 200: 220 ~ 228.
- [8] Aymerich S, Gonzy-Treboul G, Steinmetz M. J Bacteriol, 1985, 166: 993 ~ 998.
- [9] Wong S L. Gene, 1989, 83: 215 ~ 223.