

利用 *degQ* 基因提高枯草芽孢杆菌纤溶酶表达 *

金明飞 朱欣华 金 丽 卞慧芳 吴自荣 **

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 从枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中通过 PCR 扩增得到 *degQ* 基因, 将其克隆到含有枯草杆菌纤溶酶基因的蔗糖诱导表达载体 pUBS 中, 并转化至 *B. subtilis* DB403 受体菌, 得到基因工程菌 DB403 (pUBSD)。通过发酵表达证实 *degQ* 基因能增强枯草杆菌纤溶酶的表达, 酶活提高了 2.2 倍。同时还对不同种类的糖、不同浓度蔗糖、不同诱导时间等发酵条件进行优化和比较研究。

关键词: *DegQ* 基因, 增强表达, 诱导表达, 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0069-04

Enhance the Expression of *B. subtilis* Fibrinolysis Enzyme by *degQ* Gene *

JIN Ming-Fei ZHU Xin-Hua JIN Li BIAN Hui-Fang WU Zi-Rong **

(School of Life Science of East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract: The *degQ* gene, amplified from *Bacillus subtilis* by PCR, was cloned to pUBS (sucrose induced secretion vector). After transformed into DB403, recombination named DB403 (pUBSD) was formed. The results of the fermentation showed that *degQ* gene enhanced the expression of *B. subtilis* fibrin enzyme. The activity of the enzyme was increased to 2.2 times as the original one. In this article, the effects of different conditions, such as different kinds of sugar, different concentration of sucrose and different induced time were also be investigated and compared.

Key words: *DegQ* gene, Enhanced expressing, Induced expressing, *Bacillus subtilis*

本实验室已成功构建了枯草芽孢杆菌蔗糖诱导表达系统 (pUBS)^[1], 利用蔗糖诱导外源蛋白在枯草杆菌中表达, 使其在枯草杆菌大量表达蛋白酶之前得到充分表达, 从而保证目的蛋白的完整性和产率。但该系统表达量偏低, 限制了其运用。枯草芽孢杆菌外分泌蛋白产量的提高与多种因素有关, 如合适的分子伴侣及其他辅助因子、适当的信号序列、改变分泌机制、选择蛋白酶缺陷株等^[2]; 而利用正调控基因来提高蛋白酶表达是最为方便和有效的手段之一。芽孢杆菌属的 *degQ* 基因为一正调控基因, 可以提高枯草芽孢杆菌蛋白的表达^[3]。本文报道枯草芽孢杆菌来源的 *degQ* 基因的克隆和对不同来源的基因在蔗糖诱导表达载体中的增强表达作用。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli DH5 α 为 pGEM-T 的宿主菌; *B. subtilis* DB403 为 pUBS, pUBSD 的宿主菌; *B. subtilis* DB2 为 *degQ* 来源菌; 以上菌株均由本实验室保存。pGEM-T (Amp^R) 为

* 上海市科委重点科技攻关项目资助 (No. 034319217)

** 通讯作者 Tel: 021-62233295, Email: zrwu@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2004-07-14, 修回日期: 2004-09-06

degQ 基因 PCR 产物的载体, 购自 Promega 公司; pUBS (Km^R) 为蔗糖诱导表达载体, 含有芽孢杆菌纤溶酶基因, 由本实验室构建^[1]。

1.2 培养基

细菌培养用 LB 培养基, 枯草芽孢杆菌转化用 SPI, SPII 培养基^[4]。

1.3 DNA 的提取与操作

枯草芽孢杆菌 DB2 染色体的提取与纯化、枯草芽孢杆菌质粒的提取纯化及枯草芽孢杆菌的转化采用 Lin-Fa Wang 的方法^[4]; DNA 酶切、连接、大肠杆菌质粒的提取、大肠杆菌的转化均按 Sambrook 的方法^[5]。

1.4 重组菌 BSFE 表达

挑取 DB403 (pUBSD) 单菌落接种于 20 mL LB 培养基中, 37℃, 220 r/min 通气振荡培养, 10 h 获得活化的种子; 按 5% (v/v) 的接种量将其转种于含 50 mL LB 培养基摇瓶中, 2 h 后分别加不同浓度蔗糖继续培养诱导表达。每隔 4 h 取样, 离心取上清, -20℃ 保存备用。

1.5 酶活性测定

按 Deogny 等人的纤维平板法进行^[6]。

2 实验结果

2.1 *degQ* 基因的克隆

2.1.1 PCR 扩增引物的设计与合成: 根据已经发表的 *degQ* 的全序列^[7], 设计了两个引物:

*degQ*sa*Xba*I (5' 端): 5'-TGCTCTAGATTTGCGGTGTCACGCAGG-3';

*degQ*sa*Pst*I (3' 端): 5'-CAGCTGCAGCGTATAATACTTTATCCAT-3'。

2.1.2 *degQ* 基因的扩增与克隆: 以 1 μ g 枯草芽孢杆菌 DB2 染色体 DNA 作模板, 通过 28 个循环的 PCR 反应, 扩增产物约 350 bp (图 1); 用试剂盒纯化回收, 克隆至 pGEM-T, 得到重组质粒 pGEM-*degQ*, 转化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定如图 2, 重组质粒 *Pst*I/*Xba*I 双酶切可得到约 350 bp 的片段; 与 *degQ* 大小一致。测序结果 (略) 与已知序列完全一致。证明得到了 *degQ* 基因。

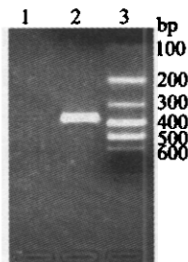


图 1 PCR 得到 *degQ* 基因

- 1 阴性对照, 2 DB2 为模板得到的 *degQ* 基因,
3 DNA marker

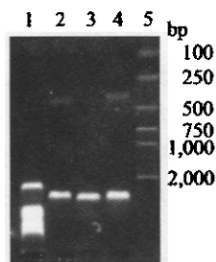


图 2 pGEM-*degQ* 酶切图谱

- 1 pGEM-*degQ* 质粒, 2 pGEM-*degQ* 质粒 *Pst*I 酶切, 3 pGEM-*degQ* 质粒 *Xba*I 酶切, 4 pGEM-*degQ* 质粒 *Pst*I/*Xba*I 双酶切, 5 DL 2,000 DNA marker

2.2 增强型诱导表达系统的构建

2.2.1 重组质粒的构建: 用 *Xba*I 与 *Pst*I 分别双酶切 pGEM-*degQ* 及 pUBS, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后用试剂盒回收 *degQ* 基因片段及 pUBS 大片段, 用 T4 DNA 连接酶连接, 将连接产物转化至 DB403, 筛选卡那霉素抗性的转化子。

2.2.2 转化子的鉴定: 转化子质粒用 *Xba*I、*Pst*I 双酶切, 电泳结果如图 3a, 其重组子质粒小片段大小与插入片段大小一致, 约为 350 bp。大片段与载体质粒 pUBS 双酶切片段大小一致, 约为 5,400 bp。以 *degQsaXba*I、*degQsaPst*I 为引物, 枯草芽孢杆菌 DB2 染色体为阳性对照, pUBS 为阴性对照, 进行 PCR 扩增, 重组子得到预期大小的片段, 约 350 bp (图 3b)。以上结果说明已将 *degQ* 基因插入 pUBS。将该重组质粒命名为 pUBSD。

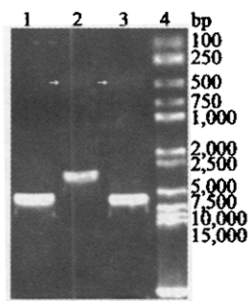


图 3a pUBSD 酶切鉴定

1 pUBSD 质粒, 2 pGEM-*degQ* 质粒 *Xba*I/*Pst*I 双酶切, 3 pUBSD 质粒 *Xba*I/*Pst*I 双酶切, 4 DNA marker

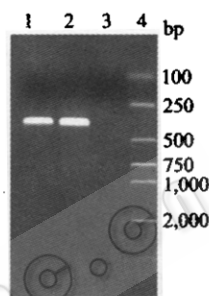


图 3b pUBSD PCR 鉴定

1 阳性对照, 2 转化子质粒, 3 阴性对照, 4 DNA marker

2.3 基因工程菌 DB403 (pUBSD) 诱导表达

2.3.1 不同种类糖对 DB403 (pUBSD) 表达的影响: 按 1.8 进行, 分别加蔗糖、果糖、葡萄糖、木糖、可溶性淀粉至终浓度 2% (w/v)。取样测定枯草杆菌纤溶酶活性。结果表明只在加蔗糖的摇瓶中测到酶活, 且 20h 左右达最高酶活。可见 pUBSD 专一的受蔗糖诱导。

2.3.2 不同蔗糖浓度对 DB403 (pUBSD) 增强表达的影响: 按 1.8 进行, 蔗糖终浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5% (w/v)。浓度为 3% 时最大酶活较其它组高, 20 h 时最高酶活达 9.62×10^6 IU/L。说明该浓度下, 蔗糖的诱导效果最好。

2.3.3 不同加糖时间对 DB403 (pUBSD) 表达的影响: 按 1.8 进行, 加蔗糖时间为 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h。结果显示 4 h 左右酶活最高; 但此时细菌生长已经进入平稳期, 枯草芽孢杆菌自身的蛋白酶开始分泌, 这不利于得到完整的目的蛋白酶^[1], 不如 2 h 好。所以选择 2 h 作为加糖时间。

2.4 基因工程菌 DB403 (pUBSD) 表达与 DB403 (pUBS) 表达差异比较

根据 2.3 所得到的最佳条件, 即 2 h 后加入终浓度为 3% (w/v) 的蔗糖, 按 1.8 的方法研究 DB403 (pUBSD) 和 DB403 (pUBS) 表达差异。结果如图 4a, 4b。图 4a 为酶活图, DB403 (pUBSD) 分泌的枯草杆菌纤溶酶最高时比 DB403 (pUBS) 提高了 2.2 倍。图 4b 为相同体积发酵液上清的 SDS-PAGE 图, 箭头处为枯草杆菌纤溶酶的特异性条带, 重组子的表达明显比对照高。可见, *degQ* 明显提高了该基因的表达。

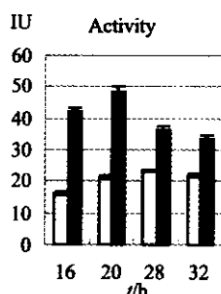


图 4a 基因工程菌 DB403 (pUBS) /DB403 (pUBSD) 发酵液酶活
□DB403 (pUBS), ■DB403 (pUBSD)

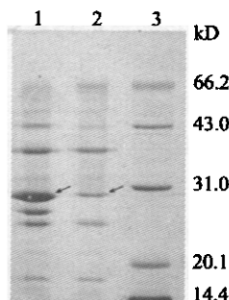


图 4b 相同体积发酵液上清 SDS-PAGE 图

1 DB403 (pUBSD) 发酵 12h, 2 DB403 (pUBS) 发酵 12h, 3 低分子量蛋白 marker

3 讨论

本研究成功地将枯草芽孢杆菌来源的 *degQ* 克隆到蔗糖诱导表达型载体 pUBS 中, 显著提高了该基因工程菌的产量。结果说明 *degQ* 基因不会干扰蔗糖诱导表达系统, 这就提示我们可以用它配合其他一些系统来改善蛋白质的表达, 运用前景广阔。*degQ* 基因可促进枯草芽孢杆菌分泌胞外酶^[3], 国内也有人利用 *degQ* 基因来提高外源蛋白的表达^[8,9], 但未见报道过利用枯草杆菌来源的 *degQ* 促进质粒上功能基因的表达。本文证实了枯草杆菌来源的 *degQ* 基因对表达外源功能基因表达的增强作用, 效果与短小芽孢杆菌来源的 *degQ* 基因效果相近^[8]。

枯草杆菌纤溶酶在溶血栓上具有很重要的应用; 但该酶存在产量不高, 纯化困难等缺点^[1]。本研究成功地提高了其产量, 有利其在生产上的运用。

degQ 基因不仅能提高目的蛋白的表达, 也增强了其他蛋白的表达 (图 4b), 但增强表达的程度却明显不同。猜测其对蛋白的增强表达作用可能有选择性^[3]。作者曾将 *degQ* 基因克隆到其他表达载体^[10], 发现其对枯草杆菌纤溶酶的表达并没有明显的增强作用; 我们又将 *degQ* 基因克隆到编码枯草杆菌谷氨酰氨转氨酶 (BTCase) 的载体中, 发现对其有很强的增强作用 (另文发表)。由此可见, *degQ* 基因的增强作用即使是在相同的启动子和调控序列下, 对不同的目的基因的促进作用存在明显的差异。关于这个问题, 我们还将作更深入的研究, 以期更好的利用 *degQ* 基因增强外源蛋白表达。

参考文献

- [1] 朱欣华, 谢芳, 黄静, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (7): 21 ~ 25.
- [2] Sui L W. Current Opinion in Biotechnology. 1995, 6: 517 ~ 522.
- [3] Antoine A, Frank K, Elisabeth A, et al. Journal of Bacteriology, 1987, 169 (1): 324 ~ 333.
- [4] Roy H D, Martina M. Biology of Bacilli: Applications to Industry. Boston: Butterworth-Heinemann. 1992. 353 ~ 358.
- [5] Sambrook J, David W. Russell Molecular Cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 16 ~ 66.
- [6] Deogny L, Weidenbach A, Hampton J. W Chin Chin Acta, 1975, 60: 85 ~ 89.
- [7] Yang M, Ferrari E, Chen E, et al. J Bacteriology, 1987, 166 (1): 113 ~ 119.
- [8] 罗进贤, 王凌, 张添元, 等. 生物化学杂志, 1997, 13 (2): 125 ~ 129.
- [9] 邓兵兵, 熊凌霜. 生物工程进展, 2000, 20 (5): 62 ~ 66.
- [10] Huang J, Fang W J, Peng X X, et al. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 2002, 10 (2): 79 ~ 87.