

利用枯草杆菌整合表达嗜铬粒蛋白抗真菌片段^{*}

李瑞芳, 罗进贤, 张添元, 贺国安, 吴江雪, 官文俊
(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 为实现 CGA1—76 片段基因在枯草杆菌中的稳定表达, 将 CGA1—76 片段基因的表达元件重组到枯草杆菌转座子质粒 pHV1249 微转座子 mini-Tn10 内, 利用 mini-Tn10 将 CGA1—76 片段基因的表达元件整合到枯草杆菌 DB1342 染色体上, 用氯霉素和红霉素筛选枯草杆菌转座工程菌 DB1342 (TnSVTQ)。DB1342 (TnSVTQ) 在无选择压力条件下经 10 d 连续传代培养, 转座子内氯霉素抗性丢失率为 0%, 说明转座子稳定整合在 DB1342 染色体上。SDS-PAGE 和免疫印迹分析结果表明, 在蔗糖诱导下, CGA1—76 片段基因在 DB1342 (TnSVTQ) 中获得表达, 产物被分泌到细胞外。孔穴琼脂扩散法测定表达上清的抑制真菌活性, 结果表明重组 CGA1—76 能抑制烟曲霉菌和黄曲霉菌的生长, 抑菌圈直径分别为 9 mm 和 8 mm。

关键词: 嗜铬粒蛋白 N 区; 基因表达; 枯草杆菌; 微转座子; 抗真菌活性

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 05-0073-03

嗜铬粒蛋白 A (Chromogranin A, CGA) 是存在于神经和内分泌细胞的由 439 个氨基酸组成的可溶性蛋白。近几年的研究表明 CGA 可被水解为许多具有不同生物活性的可溶性小肽^[1]。CGA N 端片段 CGA1—76 具有抑制血管收缩、抗细菌和抗真菌的功能^[2], 是一种很有研究价值的多肽。由烟曲霉菌、黄曲霉菌等感染引起的条件性真菌病随着免疫缺陷病人人数的增加而越来越不容忽视, 寻找高效低毒的抗真菌药物显得非常重要。枯草杆菌对人畜无害, 有完善的分泌系统^[3], 但重组质粒在枯草杆菌中往往不稳定, 影响外源基因表达水平。本文利用 pHV1249 的 mini-Tn10 将 CGA1—76 片段基因的表达元件转座整合到枯草杆菌染色体上, 并研究了枯草杆菌工程菌的遗传稳定性和重组 CGA1—76 的抗真菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH5 α 由本室保存, *B. subtilis* DB1342 为本室构建^[4], 烟曲霉菌和黄曲霉菌为广东微生物所贮存, pSVTQ 由本室构建^[5], pHV1249 由美国 B.G.S.C. 提供。

1.1.2 培养基与主要的试剂 细菌培养用 LB 培养基, 真菌培养用 PDA 培养基^[6], 枯草杆菌感受态制备用 GM I、GM II 培养基^[7], 枯草杆菌工程菌表

达用 2 $\times$ MSR 培养基^[8]。各种限制酶和修饰酶购自 NEB 公司, 蛋白质相对分子质量标准购自 Promega 公司, 小鼠单克隆抗体 5A8 (抗 CGA47—68) 由意大利 CORTI 博士惠赠; 山羊抗鼠 HRP-IgG 购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 分子克隆技术 DNA 酶切、连接, *E. coli* 转化和免疫印迹技术按 Sambrook 的方法进行^[9], *B. subtilis* 转化采用感受态转化法^[7], SDS PAGE 参见文献[11]。

1.2.2 转座实验 转座子转座参见文献[10]。

1.2.3 枯草杆菌工程菌稳定性实验 挑取枯草杆菌工程菌单菌落接种无选择压力的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 按 $\varphi=0.2\%$ 接种量接种新鲜的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养, 每 24 h 转接 1 次, 连续转接 10 次后, 涂 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 获得单菌落。随机挑取 500 个单菌落点于 LB (Cm 5 μ g/mL) 平板, 测工程菌氯霉素抗性丢失率。

1.2.4 CGA1—76 基因的表达 按文献[4]进行。

1.2.5 表达产物抗真菌活性实验 取适量真菌孢子悬液涂 PDA 平板, 用直径 7 mm 无菌打孔器在平板上打 2 个孔。将 DB1342 (TnSVTQ) 表达上清无菌加入孔内, 设不含 CGA1—76 片段基因表达元件的转座工程菌 DB1342 (mini-Tn10) 作对照, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 2~4 d。

* 收稿日期: 2003—12—18

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (011207)

作者简介: 李瑞芳 (1971 年生), 女, 博士; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 pHSV1Q 重组质粒的构建

pHV1249 发生转座必须具备 2 个条件：转座酶和 23 bp 内末端序列。为便于筛选，还需保留完整的氯霉素抗性基因。pHV1249 的 *EcoRV* 酶切位点位于内末端序列和氯霉素抗性基因之间，将外源基因克隆到 *EcoRV* 位点，得到的重组子就能发生转座。将 CGA1—76 片段基因的表 达 元 件 克 隆 到 pHV1249 的 *EcoRV* 位点得到重组质粒 pHSV1Q21（图 1）。

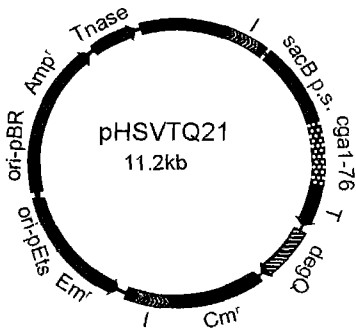


图 1 重组质粒 pHSV1Q21 的构建图

2.2 DB1342 (TnSV1Q) 的构建和转座筛选及转座工程菌稳定性

pHSV1Q21 转化枯草杆菌 DB1342，转化子的 30℃过夜培养物传代培养至 $A_{630}=0.1\sim0.2$ ，转到 51℃摇床培养 2~3 h 后，涂 LB (Cm 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板，51℃过夜培养生长的单菌落分别点于 LB (Cm 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板和 LB (Cm 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Em 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板，30℃培养过夜。结果单菌落在含氯霉素的平板上生长而在含氯霉素和红霉素的平板上不生长（图 2），表明得到的单菌落就是转座工程菌，命名为 DB1342 (TnSV1Q)。

DB1342 (TnSV1Q) 在无选择压力条件下经 10 d 连续传代培养后，将得到的单菌落分别点在含氯霉素和不含氯霉素的 LB 平板上，过夜培养后，500 个单菌落全部能在含氯霉素的平板上生长，氯霉素自然消除率为 0%（表 1），可见 DB1342 (TnSV1Q) 非常稳定。

2.3 重组 CGA1—76 在 DB1342 (TnSV1Q) 中的诱导表达

将 DB1342 (TnSV1Q) 表达上清，进行 SDS-PAGE 和免疫印迹分析，结果如图 3 所示，CGA1—76 已在 DB1342 (TnSV1Q) 中表达，产物分泌至胞外，并具免疫活性。

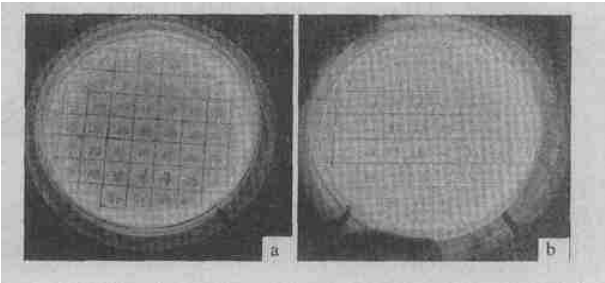


图 2 DB1342 (TnSV1Q) 在 LB (Cm) 和 LB (Cm + Em) 平板上的生长情况

Fig. 2 DB1342 (TnSV1Q) growing on LB plate supplemented with Chloramphenicol and on LB plate supplemented with Chloramphenicol and Erythromycin
a: LB (Cm) 平板; b: LB (Cm + Em) 平板

表 1 工程菌 DB1342 (TnSV1Q) 稳定性

Tah 1 Stability of engineered strain DB1342 (TnSV1Q)				
被测工程菌	培养代数	被测总菌落数	在含氯霉素平板上生长的菌落数	氯霉素抗性丢失率%
DB1342 (pHSV1Q21)	10	500	400	20
DB1342 (TnSV1Q)	10	500	500	0

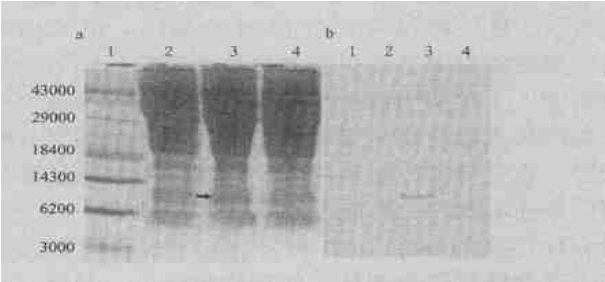


图 3 DB1342 (TnSV1Q) 表达产物的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot of expressed products from DB1342 (TnSV1Q)
a: SDS-PAGE; b: 免疫印迹

1: 蛋白质相对分子质量标准; 2: 诱导的 DB1342;
3: 诱导的 DB1342 (TnSV1Q); 4: 未诱导的 DB1342 (TnSV1Q)

2.4 重组 CGA1—76 抑制真菌活性

取 100 μL 黄曲霉菌和烟曲霉菌的孢子悬液涂 PDA 平板。将 DB1342 (TnSV1Q) 和 DB1342 (mini-Tn10) 的诱导表达上清无菌加入孔内，30℃培养 2 d，结果（图 4）表明 DB1342 (TnSV1Q) 表达产物抑制烟曲霉菌和黄曲霉菌的生长，抑菌圈直径分别为 9 mm 和 8 mm。

在枯草杆菌中表达目的基因存在质粒不稳定等问题，影响表达产量。将外源基因整合到宿主染色

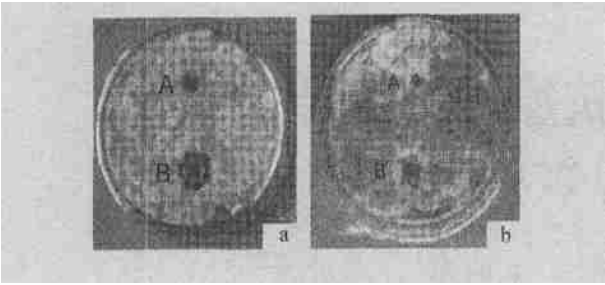


图 4 重组 CGA1—76 对烟曲霉菌 (a) 和
黄曲霉菌 (b) 生长的抑制作用

Fig 4 Inhibition of recombinant CGA1—76 on the growth of
A. fumigatus (a) and *A. flavus* (b)

A. DB1342 (mini Tn10) 蔗糖诱导培养上清;
B. DB1342 (TnSVTQ) 蔗糖诱导表达上清

体上，是克服枯草杆菌质粒不稳定的一个有效途径。利用同源重组、位点专一性重组及转座重组等方法可以实现外源基因的整合。在这三种整合方法中，同源重组和位点专一性重组会由于染色体上同源序列拷贝数限制外源基因在染色体上整合的拷贝数。而转座重组是随机整合，不受整合部位 DNA 序列的限制，外源基因在染色体上整合的拷贝数会多于同源重组和位点专一性重组。为实现外源基因稳定表达和尽可能提高表达量，本研究利用 mini-Tn10 将 CGA1—76 片段基因的表达元件通过转座整合到 DB1342 染色体上，构建了整合型表达工程菌 DB1342 (TnSVTQ)，期望获得稳定性和整合拷贝数高的转化子。DB1342 (TnSVTQ) 经过 10 d 无选择压力的连续传代培养，氯霉素抗性不丢失，可见 DB1342 (TnSVTQ) 具有很高的稳定性；但从 CGA1—76 的表达情况看，其表达水平仍然不够理想，

可能是整合的拷贝数仍然不高，需要通过反复筛选才能获得表达量高的转化子。

参考文献:

[1] SIMON J P, AUNIS D. Biochemistry of the chromogranin A protein family[J] . Biochem J, 1998, 262: 1—13.
[2] TAUPENOT L, REMACLE J E, HELLE K B et al. Recombinant human chromogranin A: expression, purification and characterization of the N-terminal derived peptides[J] . Regul Pept, 1995, 56: 71—88.
[3] WONG S L. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins[J] . Curr Biology, 1995, 6: 517—522.
[4] 吴青, 罗进贤, 徐柏年, 等. 枯草杆菌诱导型高效表达—分泌系统的构建[J] . 自然科学进展, 2001, 11(1): 40—46.
[5] 李瑞芳, 罗进贤, 张添元. 嗜铬粒蛋白 N 端片段基因在枯草杆菌中的表达及表达产物的活性分析[J] . 生物工程学报, 2004, 20(2): 274—278.
[6] 钱存柔. 微生物实验[M] . 北京: 北京大学出版社, 1985: 42.
[7] SPIZZEN J. Transformation of biochemically deficient strain of *B. subtilis* by deoxyribonucleate[J] . Proc of Natl Acad Sci USA, 1958, 44: 1072—1078.
[8] YE R Q, KIM J H, KIM B G, et al. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *B. subtilis*[J] . Biotechnol and Bioeng, 1999, 62: 87—96.
[9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning, A laboratory manual[M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1994.
[10] PETIT M A, CLAUDE B L J, EHRLICH S D. Tn10-derived transposons active in *Bacillus subtilis* [J] . J Bacteriol, 1990, 172(12): 6736—6740.
[11] 吴冠云, 潘华珍, 吴 . 生物化学与分子生物学常用实验数据手册[M] . 北京: 科学出版社, 1999: 190—192.

Expression of N domain of Chromogranin A in *B. subtilis* by
Mini-Tn10 Transposition and Examination of Its Antifungal Activity

LI Rui fang, LUO Jin xian, ZHANG Tian yuan, HE Guo an, WU Jiang xue, GUAN Wen jun

(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education //

School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To ensure the stable expression of CGA1—76 in *B. subtilis*, the expression cassette of CGA1—76 was inserted into mini Tn10 of pHV 1249 and was transposed into the chromosome of *B. subtilis* DB1342 resulting in the engineered strain *B. subtilis* DB1342 (TnSVTQ) which has only chloramphenicol resistance and lose erythromycin resistance. DB1342 (TnSVTQ) was still stable after 10 generations of growth in LB medium without selection stress. CGA1—76 was expressed in DB1342 (TnSVTQ) by sucrose induction and secreted into the medium as shown by SDS-PAGE and western blot. The antifungal activity of expressed product was examined, and the result showed that the expressed product can inhibit the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* with inhibition zones 9 mm and 8 mm, respectively.

Key words: Chromogranin A N domain; gene expression; *Bacillus subtilis*; mini Tn10; antifungal activity