

# 分泌载体pPSA18的构建及地衣杆菌 淀粉酶在枯草杆菌中的表达和分泌\*

张添元 罗进贤 李文清

(中山大学生物工程研究中心/生物系)

**摘要** 本文报道利用枯草杆菌噬菌体Spol的启动子Spac I,合成的解淀粉芽胞杆菌信号序列及枯草杆菌质粒PUB 18重组,构建分泌型表达载体并将地衣芽胞杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因(缺失启动子及信号序列)引入构建的载体,获得重组质粒pPSA 18。将此质粒转化枯草杆菌QB1130(*amy*<sup>-</sup>)感受态细胞,在含5  $\mu$ g/ml卡那霉素及1%可溶性淀粉的LB平板上筛选K<sup>m</sup>r及淀粉酶阳性的转化子。从阳性转化子中提取质粒,经酶切分析后重新转化枯草杆菌QB1130,得到的转化子全部都能向胞外分泌淀粉酶,证明构建的载体能在枯草杆菌中表达和分泌外源基因产物。

**关键词** 枯草杆菌,分泌载体, $\alpha$ -淀粉酶基因,基因表达和分泌

枯草杆菌的重要特征是它能合成和向胞外分泌大量的酶和蛋白质,研究其蛋白质分泌的机制对于利用枯草杆菌工业规模的合成外源基因产物有重要意义<sup>[1]</sup>。八十年代以来,国外开始用克隆的枯草杆菌和解淀粉芽胞杆菌的 $\alpha$ -淀粉酶<sup>[2~4]</sup>和蛋白酶<sup>[5~7]</sup>基因的启动子和信号序列构建分泌载体实现了大肠杆菌的 $\beta$ -内酰胺酶基因、金黄色葡萄球菌的A蛋白基因以及人的干扰素基因、心房肽基因在枯草杆菌中的表达和分泌。我们采用基因重组技术从枯草杆菌染色体中克隆了一批启动子-信号序列,并利用部分克隆序列构建分泌载体,实现地衣芽胞杆菌缺失了启动子-信号序列的 $\alpha$ -淀粉酶基因的表达和分泌<sup>[1]</sup>。本文报道利用枯草杆菌Spol病毒的Spac I启动子及人工合成的解淀粉芽胞杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因的信号序列构建枯草杆菌的分泌型表达载体表达和分泌地衣杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及质粒

本文所用菌株及质粒列于表1。

本文1992年7月8日收到

\*国家“七五”重点科技攻关项目资助

1)罗进贤等.国家“七五”重点科技攻关项目第七十一项生物技术论文摘要。1990年12月,4

表1 菌株和质粒  
Tab. 1 Bacterial strains and plasmids

菌株 Strains	基因型 Genotype	来源 Sources
<i>E. coli</i> JM101	thi proAB strA supE	Pasteur Institute
<i>B. subtilis</i> QB1130	metB Sac321 artI909 amy <sup>-</sup>	Monod and Jacob Institute
质粒 plasmids		
pUC18	Amp <sup>r</sup>	Pasteur Institute
pUB18	Km <sup>r</sup>	Dr. Doi
pPL703 (SpacI)	Neo <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Dr. Lovett
pPA222	Amp <sup>r</sup> amy <sup>+</sup>	This laboratory
pUCS4	Amp <sup>r</sup>	This laboratory
pUCPS7	Amp <sup>r</sup>	This laboratory
pUBA1	Km <sup>r</sup> amy <sup>-</sup>	This laboratory
pPSA18	Km <sup>r</sup> amy <sup>+</sup>	This laboratory

## 1.2 培养基

大肠杆菌和枯草杆菌的培养用L-肉汤, 固体平板为L-肉汤加1.5%琼脂及适量抗生素, 枯草杆菌感受态细胞转化用GM I及GM II培养基<sup>[8]</sup>。

## 1.3 主要试剂

限制酶Pst I, EcoR I, Xba I, Hind III为GIBCO-BRL公司产品, T4DNA聚合酶, dATP, dCTP, dGTP及dTTP为New England Biolab. 公司产品, Bal31, T4DNA连接酶由华美生物工程公司提供, 余为国产分析纯试剂。反应缓冲液按厂家提供的配方。

## 1.4 DNA的分离、纯化与处理

质粒DNA的提取按文献的方法<sup>[9]</sup>, 获得的粗抽提液通过Sepharose 4B凝胶柱层析纯化。质粒的快速检测采用Doly的方法<sup>[10]</sup>。DNA限制酶片段的分离采用低熔点琼脂糖凝胶电泳法。电泳后切下所需片段置1.5 ml离心管中, 加2倍体积酒精沉淀, 溶于适量TE中。

## 1.5 解淀粉芽胞杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因信号序列的合成

按已发表的基因序列<sup>[11]</sup>采用基因合成仪在Y.W.Kan的实验室合成, 该信号序列共有31个氨基酸相当于93个碱基对, 两端加上PstI切口, 共97个碱基对。

## 1.6 DNA的连接和转化

DNA的连接和转化按Maniatis的方法<sup>[9]</sup>, 大肠杆菌转化按Cohen的方法<sup>[12]</sup>, 枯草杆菌转化参照Spizizen的方法<sup>[8]</sup>。

## 1.7 淀粉酶阳性菌落的检测和酶活力的测定

将转化细胞涂布在含1%可溶性淀粉的固体LB平板上, 37℃培养过夜, 将I<sub>2</sub>-KI溶液倒入平板, 周围出现白色透明圈的即为淀粉酶阳性菌落。 $\alpha$ -淀粉酶活力测定采用3,

5-二硝基水杨酸法<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质粒pUCPS7的构建

考虑到利用大肠杆菌进行DNA操作比较方便,我们先将合成的信号序列及 Spac I 启动子重组进大肠杆菌质粒pUC18,然后再转入枯草杆菌质粒pUB18构建分泌型表达载体。如图1所示,用限制酶Pst I将质粒pUC18切开与合成的信号序列连接,构建质粒pUCS4,将此质粒转化大肠杆菌JM101进行扩增。用EcoR I, Xba I将Spac I启动子从质粒pPL703 (Spac I)上切下,低熔点琼脂糖电泳分离后接到扩增的质粒pUCS4的EcoR I-Xba I位点上,转化大肠杆菌JM101,从含氨基青霉素的平板上挑取阳性菌落,提取质粒,经酶切分析后,获得含Spac I启动子及信号序列的重组质粒pUCPS7。此质粒经EcoR I, Pst I酶切后得到2.7及0.4 Kb二个片段(图2),后者包含0.3Kb的启动子及97bp的信号序列(图3)。

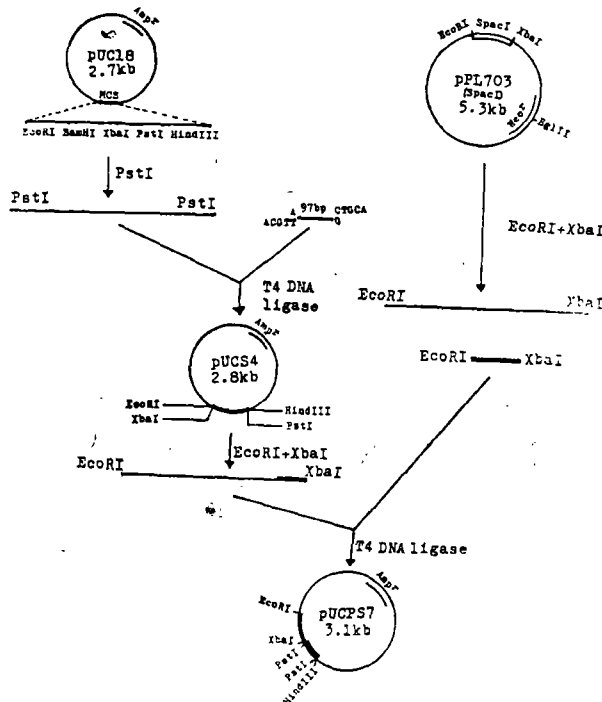


图1 质粒pUCPS7的构建

Fig.1 Construction of plasmid pUCPS7

### 2.2 分泌型表达载体pPSA18的构建

如图4所示,先用限制酶Pst I及Hind III将地衣芽胞杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因片段从质粒pPA222上切下,该Pst I-Hind III片段长1.6kb,含完整的编码顺序但不包括启动子及信号序列。将此片段插入枯草杆菌质粒pUB18(Km<sup>r</sup>)的Pst I和Hind III两个位点之间,组建质粒pUBA1。将Spac I启动子和合成的信号序列用限制酶EcoR I和 Xba I从质粒pUCPS7上切下,插到质粒pUBA1的EcoR I-Xba I位点上,构建分

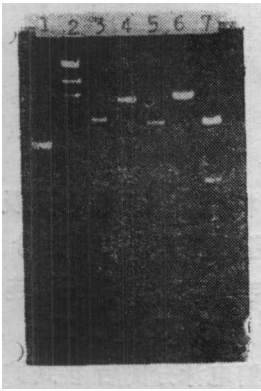


图2 质粒pUCPS7, pPSA18, pUBA1的酶切电泳图

Fig.2 Restriction patterns of plasmids pUCPS7, pPSA18 and pUBA1

- 1 pUCPS7/EcoRI + PstI
- 2 λcl857s7/ DNA/HindIII
- 3 pPSA18/PstI + HindIII
- 4 pPSA18/EcoRI + PstI
- 5 pPSA18/EcoRI + HindIII
- 6 pPSA18/PstI
- 7 pUBA1/PstI + HindIII

5'-GAATTCTACACAGCCCAGTCCAGACTATTCCGGCACTGAAATTATGG  
 GTGAAGTGGTCAAGACCTCACTAGGCACCTTAAAAATAGCGCACCCCTGAA  
 GAAGATTATTGAGGTAGCCCTTGCCCTACCTAGCTCCCAAGAAAGATAT  
 CCTAACAGCACACGAGCGGAAAGATGTTTGTCTACATCCAGAACAAACC  
 TCTGCTAAAAATTCCTCAAAAATTTGCAAAAAGTTGTTGACTTTATCTAC  
 AAGTGTGGCATAATGTGTTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAA  
 SpacI Prom. synthetic signal sequence  
 GGAGGTGATCTAGAGTCGACCTGCAATG ATT CAA AAA CGA AAG  
 rbs met ile gln lys arg lys  
 CGG ACA GTT TCG TTC AGA CTT GTG CTT ATG TGC ACG CTG  
 arg thr val ser phe arg leu val leu met cys thr leu  
 TTA TTT GTC AGT TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA GCC TGC  
 leu phe val ser leu pro ile thr lys thr ser ala cys  
 A-3'

图3 Spac I 启动子和合成信号序列的核苷酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of the Spac I promoter and the synthetic signal sequence

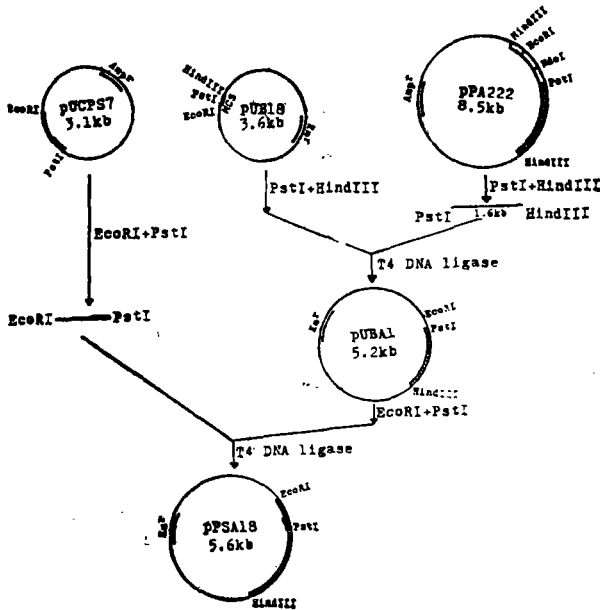


图4 分泌表达载体pPSA18的构建

Fig.4 Construction of secretive expression vector pPSA18

泌型表达载体pPSA18。将构建质粒转化枯草杆菌BD224的感受态细胞,在抗性平板上筛选卡那霉素抗性转化子,提取质粒用EcoR I, Pst I双酶切可得一个0.4Kb的小片段(合成信号序列两端的Pst I位点,在与Spac I启动子连接后已丢失其中一个,用Pst I不能把启动子和信号序列切开),用Pst I和Hind III双酶切可得到1.6Kb的淀粉酶的编码顺序(图2),这表明质粒pPSA18的构建是成功的。

### 2.3 地衣芽胞杆菌 $\alpha$ -淀粉酶基因在枯草杆菌中的表达

将构建的重组质粒pPSA18转化枯草杆菌QB1130(*amy*<sup>-</sup>)的感受态细胞,在含5 $\mu$ g/ml卡那霉素和1%可溶性淀粉的LB平板上筛选K<sup>m</sup>r<sup>r</sup>及淀粉酶阳性菌落,发现在K<sup>m</sup>r<sup>r</sup>转化子中,90%以上都能向胞外分泌淀粉酶。从部分淀粉酶阳性转化子中分离质粒,经限制酶切分析后证实,淀粉酶阳性转化子所含质粒是pPSA18(图2)。将枯草杆菌QB1130(pPSA18),同时以含淀粉酶完整基因(即包括其本身的启动子及信号序列)的质粒pUBA33的枯草杆菌QB1130(pUBA33)及含淀粉酶完整基因的质粒pJ07的大肠杆菌HB101(pJ07)作对照,接种至5ml L-肉汤培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养24h。用二硝基水杨酸法测定培养上清液中及胞内(超声波破碎细胞)淀粉酶活力,结果见表2。从表中可见,在构建的表达系统中(pPSA18)淀粉酶基因的表达水平是用原启动子时(pUBA33)的2倍而且90%以上的产物分泌至胞外。

以上结果表明,我们构建的表达和分泌系统具有表达和分泌外源蛋白的功能,为真核生物基因在枯草杆菌中的表达和分泌创造了条件。

表2 枯草杆菌和大肠杆菌克隆的胞内和培养基中淀粉酶活力  
(pUBA33和pJ07包含带自身启动子和信号序列的淀粉酶完整基因)

Tab.2 Amylase activities in cell pellets and culture supernatants of *B. subtilis* and *E. coli* clones

Clones	Amylase activities (u/ml)			Secretion (%)
	Supernatants	Cell pellets	Total	
<i>B. subtilis</i> QB1130 (pPSA18)	99.40	10.90	119.30	90.44
<i>B. subtilis</i> QB1130 (pUBA33)	56.79	5.208	62.00	91.6
<i>E. coli</i> HB101 (pJ07)	2.32	28.22	30.54	8.22

pUBA33 and pJ07 are plasmids harboring the total amylase gene with promoter and signal sequence

### 参 考 文 献

- 1 Priest F G. *Bacteriol Rev*, 1977, 41:711~753
- 2 Sarvas M. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1986, 125:103~107
- 3 Saunders C W *et al.* *J Bacteriol*, 1969:2917~2925

- 4 Schein C H *et al.* *Bio/Technology*, 1986, 4:719~725
- 5 Honjo M *et al.* *J Biotechnol*, 1986, 4:63~71
- 6 Vasantha N, Thompson L D. *J Bacteriol*, 165:837~842
- 7 Wang L F *et al.* *Gene*, 1988, 69:39~47
- 8 Anagnostopoulos G, Spizizen J. *J Bacteriol*, 1961, 81:741~745
- 9 Maniatis T *et al.* *Mol Cloning*, CSHL, New York, 1982, 90~91
- 10 Birnboim H C, Doly J. *Nucl Acid Res*, 1979, 7:1513~1523
- 11 Palva I *et al.* *Gene*, 1981, 15:43~51
- 12 Cohen S N *et al.* *PNAS, USA*, 1972, 69:2110~2114
- 13 Griffin P J *et al.* *J Appl Chem Biotechnol*, 1973, 23:297~300

## Construction of Secretion Vector pPSA18 and Expression and Product Secretion of *B. licheniformis* Alpha-amylase Gene from *B. subtilis*

Zhang Tianyuan\* Luo Jinxian Li Wenqing

**Abstract** Studies on protein secretion are of great importance for the synthesis of foreign gene products in *Bacilli* on an industrial scale. We report here the construction and use of secretion vector pPSA18 in *B. subtilis*. The vector was constructed by ligating *spacI* promoter of phage *spol*, synthetic signal sequence of alpha-amylase gene from *B. amyloliquefaciens* with plasmid pUB18. The alpha-amylase gene lacking promoter and signal sequence of *B. licheniformis* was inserted downstream of the promoter and signal sequence on the constructed secretion vector to result in plasmid pPSA18. pPSA18 was used to transform *B. subtilis* QB1133 and screened on LB plates supplemented with 5 $\mu$ g/ml kanamycin and 1% soluble starch. All transformants secrete amylase into the medium, indicating that the constructed vector is functional in *B. subtilis*.

**Keywords** *Bacilli subtilis*, secretion vector, alpha-amylase, gene expression, product secretion

\* Biotechnology Research Center and Department of Biology, Zhongshan University