

基于 pHY300PLK 的分泌表达载体的构建

覃君君¹, 江均平^{2,3*}, 李春红^{2,3}, 戴良英¹

(1.湖南农业大学生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100093; 3.农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室, 北京 100093)

摘 要:用 PCR、酶切、连接方法将地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因(*amy*)表达单元(包括启动子、信号肽及淀粉酶基因)克隆到 pHY300PLK 中,并用反向 PCR、同源重组方法,去除重组质粒的氨苄抗性基因,以利用 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽高效表达自身蛋白及外源蛋白。结果表明:连入了 α -淀粉酶表达单元的 pHY300PLK,即 pAMY 质粒能够分泌表达 α -淀粉酶,且去除了氨苄抗性基因的 pAMY 质粒,即 pAMY1 质粒能更有效的表达 α -淀粉酶;将纤维素酶基因连接到 pAMY1 质粒中淀粉酶信号肽的下游,得到的重组质粒 pCEL 能分泌表达纤维素酶,表明 α -淀粉酶基因的启动子和信号肽不仅能启动自身蛋白的表达,也能启动外源蛋白的表达;重组菌的生长情况与质粒拷贝数的比较表明,与 pAMY 质粒相比去除了氨苄抗性基因的 pAMY1 质粒对重组菌的生长没有影响,且 pAMY1 质粒在重组菌的复制效率更高,能更高效的表达蛋白,以上结果证明 pHY300PLK 克隆质粒已成功改造成表达质粒,下一步可用于更多外源基因的分泌表达。

关 键 词:地衣芽孢杆菌; α -淀粉酶; 同源重组; 表达质粒; 纤维素酶; 分泌表达

中图分类号: Q81

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)01-0052-06

Construction of an secretory expression vector based on pHY300PLK

QIN Jun-jun¹, JIANG Jun-ping^{2,3*}, LI Chun-hong^{2,3}, DAI Liang-ying¹

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 3.Key Laboratory of Agricultural Product Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

Abstract: The expression unit of heat-stable α -amylase (*amy*) gene including the promoter, signal peptide and amylase gene was amplified by PCR and then digested and ligated into cloning vector pHY300PLK. The anti-ampicillin gene of the recombinant plasmid was deleted by inverse PCR and homologous recombination for high expression of auto-protein and heterogeneous protein using the promoter and signal peptide of α -*amy* gene. The result indicated that the pHY300PLK with anti-ampicillin gene, namely, plasmid pAMY, could express secretory α -amylase in host strain while the plasmid pAMY without anti-ampicillin gene, namely, plasmid pAMY1, could express the secretory α -amylase more efficiently. Then the cellulase gene was inserted into the vector pAMY1 at the position immediately after the promoter and signal peptide of α -*amy* gene, the resulting recombinant plasmid, named pCEL could express secretory cellulase in host strain. These results indicated the promoter and signal peptide of α -*amy* gene could express not only α -amylase but also foreign protein as well. According to the growth curve of recombinant strains and the plasmid copy number of pAMY and pAMY1, deletion of the anti-ampicillin showed no influence on the growth of the recombinant strain while improved the replication efficiency of the plasmid, leading to higher expression of protein by pAMY1. The above results suggested the cloning vector pHY300PLK was modified into expressing vector and could be used further

收稿日期: 2012-08-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-09-06B); 中央级公益性科研院所基本科研专项(2012ZL034); 北京市自然科学基金项目(5083025)

作者简介: 覃君君(1985—), 男, 湖南怀化人, 硕士, 主要从事微生物基因工程的研究, junjunqin@yahoo.cn; *通信作者, jiangjunping@yahoo.com.cn

in the expression of other heterogeneous proteins.

Key words: *Bacillus licheniformis*; α -amylase; homologous recombination; expression vector; cellulase; secretory expression

大肠杆菌是最早用于重组蛋白生产的菌种,其遗传背景清楚、培养操作简单、成本低廉,可以快速大规模地生产目的蛋白^[1],其表达的目的蛋白量可超过细菌总蛋白量的30%;因此,大肠杆菌是目前应用最广泛的蛋白质表达系统^[2]。但是,用大肠杆菌生产重组蛋白,得到的目的蛋白常以包涵体形式表达,产物纯化困难,利用信号肽介导表达蛋白分泌到胞外是解决这一问题的一种有效方法^[3]。

地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶(α -amylase)的启动子在枯草芽孢杆菌中可以高效启动转录^[4],其信号肽可以有效介导表达蛋白的分泌^[5],而以大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒pHY300PLK^[6]为基本骨架,构建的表达质粒能够实现基因的表达。笔者采用DNA重组技术将 α -淀粉酶基因(*amy*)表达单元(包括启动子、信号肽、 α -淀粉酶基因)构建到克隆载体^[7]pHY300PLK中,并删除重组pHY300PLK中的氨苄抗性基因,以期获得能够高效分泌表达外源基因的表达载体^[8-9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

pHY300PLK质粒、*E. coli*Top10、*Bacillus licheniformis* ATCC14580由农业部农产品加工与质量控制重点实验室保存;含纤维素酶基因的质粒pUC57-*cel*由农业部农产品加工与质量控制重点实验室构建^[10]。

1.1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶EcoRI、HindIII为Chimerx公司产品,PstI为TaKaRa公司产品,FastPfu DNA Polymerase、T4 DNA ligase为北京全式金生物技术有限公司产品,其他试剂为分析纯或试剂级。

1.1.3 引物

根据*Bacillus licheniformis* ATCC14580的 α -淀粉酶基因序列(GenBank 登录号:CP000002)设计引

物对P1和P2,用于扩增 α -淀粉酶表达单元。P1引物的序列为5'-tgagcttattggtactgtatctcagcttgaag-3';P2引物的序列为5'-atgaattcctatcttgaacataaattgaac-3';引物序列下划线部分依次为HindIII、EcoRI酶切位点。

根据pHY300PLK载体基因序列设计引物对P3和P4,用于反向PCR,去除氨苄抗性基因。P3引物的序列为5'-caacacttcaacgcacgtaactgtcagaccaag-3';P4引物的序列为5'-gtcggtgaagtgttg-3'。

根据质粒pUC57-*cel*的基因序列设计引物对P5和P6,用于扩增纤维素酶基因。P5引物的序列为5'-ttctgcagcagcggcggtgtacaa gactcc-3';P6引物的序列为5'-acaggaattcttgctagtgtgctcagtagcc-3';引物序列下划线部分依次为Pst I、EcoRI酶切位点。

1.2 方法

1.2.1 重组DNA技术和分子克隆技术

B. licheniformis ATCC14580染色体DNA的提取以及质粒DNA的快速提取参照文献[11]进行。DNA片段的亚克隆,酶切和连接技术参照文献[12]进行,大肠杆菌感受态制备及转化采用余炎林介绍的方法^[13]。

1.2.2 α -淀粉酶分泌表达质粒pAMY、pAMY1的构建

以*B. licheniformis*染色体DNA为模板,用引物对P1和P2进行PCR(95℃、5 min;95℃、20 s,56℃、20 s,72℃、60 s,35 cycles;72℃、10 min),扩增*amy*表达单元,包括启动子(promoter)、信号肽(signal peptide)及 α -淀粉酶结构基因(*amy* gene)。*amy*表达单元的PCR产物及pHY300PLK载体同时用HindIII、EcoRI双酶切,用T4DNA ligase连接,将*amy*表达单元连入pHY300PLK载体,转化*E. coli* Top10,将转化菌液涂布于SOB鉴别平板(0.01%酚蓝、1%淀粉、20 μ g/mL四环素)上,37℃培养1~3 d,对产生透明圈的转化子提质粒,并送北京三博远志生物技术有限责任公司测序,测序正确者命名为pAMY质粒(6 559 bp,图1)。

以pAMY质粒为模板,用引物对P3和P4进行

PCR(95 °C、5 min ; 95 °C、20 s , 51 °C、20 s , 72 °C、210 s , 35 cycles ; 72 °C、10 min), 得到无氨苄抗性基因的 pAMY 1 质粒片段。PCR 产物通过同源重组转化 *E. coli* Top10, 提质粒, 将转化菌液涂布于 SOB

鉴别平板 (0.01% 苌盼蓝、1% 淀粉、20 $\mu\text{g/mL}$ 四环素) 上, 37 °C 培养 1~3 d, 对产生透明圈的转化子提质粒, 并送北京三博远志生物技术有限责任公司测序, 测序正确的命名为 pAMY1 质粒(5 218 bp, 图 1)。

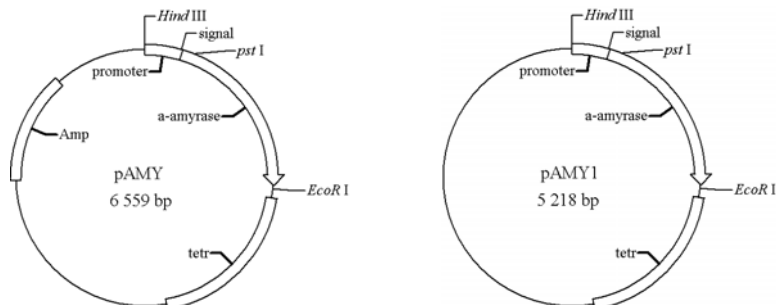


图 1 质粒 pAMY 和 pAMY1 的结构图

Fig.1 Structure of plasmid pAMY and pAMY 1

1. 2. 3 纤维素酶表达质粒 pCEL 的构建

以含纤维素酶基因的 pUC57-*cel* 质粒为模板, 用引物对 P5 和 P6 进行 PCR, 扩增纤维素酶基因(*cel*), 用 *Pst* I 和 *Eco* R I 同时双酶切扩增的纤维素酶基因片段及 pAMY 1 质粒, 用 *T4* DNA ligase 将纤维素酶基因连入 pAMY 1, 转化 *E. coli* Top10, 将转化菌液涂布于 SOB 鉴别平板(0.01% 苌盼蓝、1% CMC-Na、20 $\mu\text{g/mL}$ 四环素)上, 37 °C 培养 1~3 d, 对产生透明圈的转化子克隆提质粒, 并送北京三博远志生物技术有限责任公司测序, 测序正确的为纤维素酶表达质粒 pCEL(5 154 bp, 图 2)。

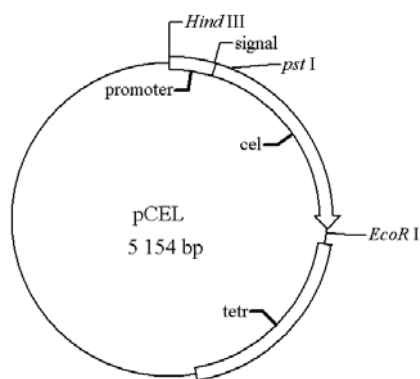


图 2 质粒 pCEL 的结构图

Fig.2 Structure of plasmid pCEL

1. 2. 4 α -淀粉酶与纤维素酶在发酵液中的表达及测定

从平板挑 α -淀粉酶转化子(含氨苄抗性基因)、 α -淀粉酶转化子(不含氨苄抗性基因)、纤维素酶转化子单菌落分别接入 3 mL SOB 液体培养基(四环素

浓度 20 $\mu\text{g/mL}$) 中, 150 r/min、37 °C 培养 24 h, 作为菌种; 将菌种稀释至 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.5, 分别按 2% 接种量接入 25 mL 液体 SOB (四环素 20 $\mu\text{g/mL}$) 中, 200 r/min、37 °C 培养发酵。发酵液经 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 作为粗酶液, 用于活性测定及 SDS-PAGE。 α -淀粉酶活性测定参考文献[14]、纤维素酶活性测定参考文献[15]、 α -淀粉酶及纤维素酶的 SDS-PAGE 参照参考文献[16]进行。

1. 2. 5 重组菌生长曲线的测定

含 PAMY 和 PAMY1 质粒的重组菌以 SOB 为培养基, 于摇床中 37 °C、200 r/min 培养 120 h, 每隔 4 h 测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 的值, 作出生长曲线。

1. 2. 6 质粒拷贝数的测定

含 PAMY 和含 PAMY1 的重组菌以 SOB 作培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养 30 h, 测 $OD_{600\text{ nm}}$ 值, 取等量菌体提取质粒, 琼脂糖电泳后拍照片, 用凝胶成像软件检测质粒浓度。

2 结果与分析

2.1 α -淀粉酶基因分泌表达质粒 pAMY 和 pAMY1 的鉴定

以引物对 P1 和 P2 扩增的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因表达单元包括启动子、信号肽及淀粉酶基因的大小为 1 719 bp, 测序结果与 GenBank 中的序列一致。HindIII、EcoRI 双酶切扩增产物及 pHY300PLK 载体, 酶连产物, 转化 *E. coli* Top10, 筛选转化子 *E. coli* pAMY。对转化子提质粒测序,

序列正确。用引物对 P3 和 P4 反向扩增 pAMY PCR 产物同源重组后转化 *E. coli* Top10, 筛选无氨苄抗性的转化子 *E. coli* pAMY1。对转化子提质粒测序, 序列正确。转化子在含淀粉筛选平板可水解淀粉, 产生透明圈(封三图 3)。

2.2 纤维素酶基因表达质粒 pCEL 的鉴定

筛选转化子 *E. coli* pCEL, 对转化子提质粒、测序, 序列正确。转化子在含纤维素筛选平板可水解纤维素, 产生透明圈(封三图 4)。

2.3 α -淀粉酶的活性

将转化子 *E. coli* pAMY 和 *E. coli* pAMY1 发酵, 每隔 12 h 测定酶活。*E. coli* pAMY1 转化子 α -淀粉酶活性约为 *E. coli* pAMY 的 2 倍(图 3), 104 h 时

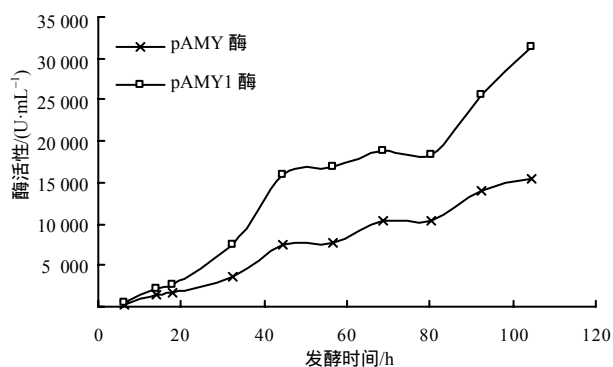


图3 *E. coli* pAMY 和 *E. coli* pAMY₁ 表达淀粉酶的活性

Fig.3 Activity of Amylase expressed by *E. coli* pAMY and *E. coli* pAMY₁

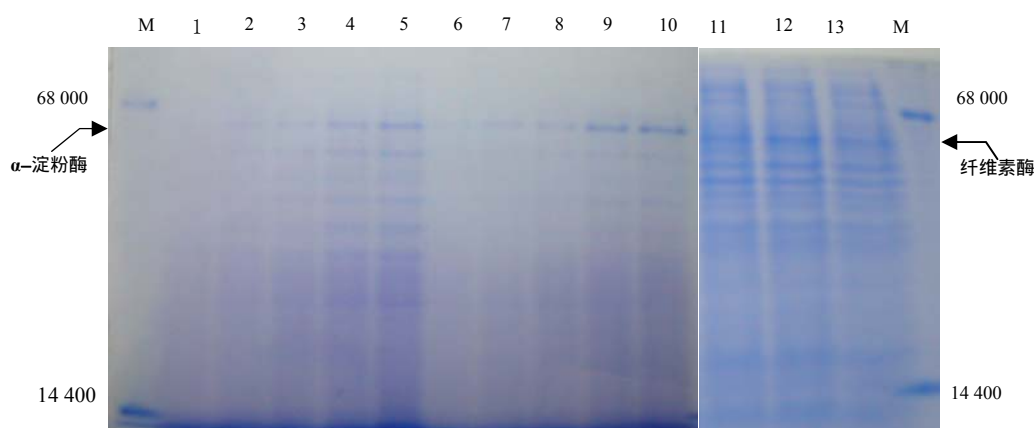
E. coli pAMY 转化子的酶活性为 15 400 U/mL, *E. coli* pAMY1 转化子的酶活性为 31 400 U/mL。

2.4 纤维素酶的活性

将转化子 *E. coli* pCEL1、*E. coli* pCEL2、*E. coli* pCEL3, 发酵 72 h, 收集表达产物, 测得发酵粗酶液中纤维素酶酶活分别为 0.56、0.54、0.55 U/mL。活性相近, 说明外源基因在载体 pAMY 1 上稳定表达。

2.5 α -淀粉酶与纤维素酶表达产物的 SDS-PAGE

表达淀粉酶的转化子发酵后, 取 15 μ L 不同发酵时间的粗酶液进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, *E. coli* pAMY 及 *E. coli* pAMY1 转化子在相对分子质量 68 000 附近均有一条蛋白带, 这与 α -淀粉酶相对分子质量约为 60 000^[17]相符, 相同发酵时间, *E. coli* pAMY1 的蛋白带浓度均比 *E. coli* pAMY 的高(图 4)。以上结果表明, 删除氨苄抗性基因可以提高 α -淀粉酶的表达水平。将转化子 *E. coli* pCEL1、*E. coli* pCEL2、*E. coli* pCEL3, 发酵后, 取 15 μ L 发酵 72 h 粗酶液进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色后可见纤维素酶蛋白带浓度相近, 相对分子质量约为 55 000^[18], 与理论值相符(图 4)。



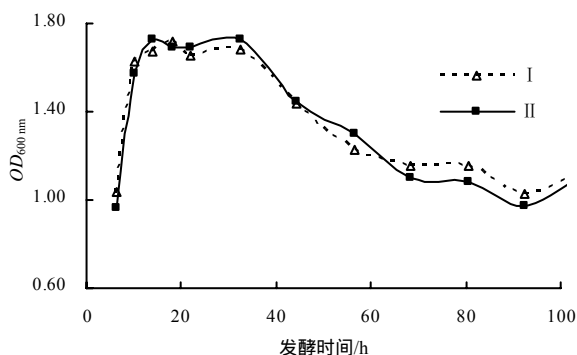
M示蛋白质Marker; 1~5示*E. coli* pAMY, 6~10示*E. coli* pAMY1对应的发酵时间1, 6为12 h; 2, 7为24 h; 3, 8为48 h; 4, 9为72 h; 5, 10为96 h; 11~13示*E. coli* pCEL对应的发酵时间都为72 h。

图4 重组大肠杆菌表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.4 SDS-PAGE of expressed product by recombinated *E. coli*

2.6 氨苄抗性基因删除对菌生长的影响

E. coli pAMY、*E. coli* pAMY1 转化子生长曲线如图 5, 两种转化子生长基本一致。结果表明, 删除氨苄抗性基因不影响菌体生长。



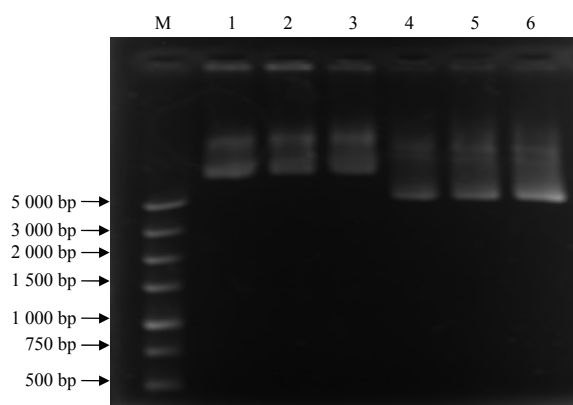
I *E. coli* pAMY; II *E. coli* pAMY1。

图 5 重组大肠杆菌生长曲线

Fig.5 Growth curve of recombinated *E. coli*

2.7 氨苄抗性基因删除对质粒拷贝数的影响

将 *E. coli* pAMY、*E. coli* pAMY1 转化子培养 30 h, 测 OD_{600nm} 值得到菌浓度, 取等量菌体提取质粒, 琼脂糖电泳检测质粒浓度, pAMY 和 pAMY1 的质量相同。由于 pAMY 含 6 559 bp、pAMY1 含 5 218 bp, 所以 pAMY1 质粒的浓度为 pAMY 的 1.28 倍(图 6), 表明删除氨苄抗性基因提高了质粒的复制效率。



M DNAMarker; 1~3 pAMY; 4~6 pAMY1。

图 6 *E. coli* pAMY 和 *E. coli* pAMY1 中质粒的含量

Fig.6 Concentration of pAMY and pAMY1 in *E. coli*

3 讨论

克隆质粒 pHY300PLK 常被作为基本骨架构建表达质粒。Yoshimoto 等^[19] 利用穿梭质粒载体

pHY300PLK 克隆 *amylosacchariticus(apr)* 基因表达原件并成功表达。Surnitomo 等^[20]将碱性纤维素酶的基因克隆到大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的穿梭载体 pHY300 PLK 中, 利用碱性纤维素酶本身的启动子和核糖体结合位点实现了重组纤维素酶的高效表达。CHEN Chao-ying 等^[21]将来源于 *Bacillus circulans* WL-12 的几丁质酶基因 *chiA* 与载体 pHY300PLK 连接, 可转化枯草芽孢杆菌并表达。

pHY300PLK 为克隆载体, 不含启动子与信号肽, 含有 1 个氨苄抗性基因和 1 个四环素抗性基因。pHY300PLK 克隆载体中的四环素抗性基因在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中均有选择标记作用, 氨苄抗性基因在枯草芽孢杆菌中无选择标记作用, 在多数情况下氨苄抗性基因是多余的, 而且影响质粒的转化效率^[12]。本试验以 pHY300PLK 为出发载体, 构建了去除氨苄抗性基因的表达载体 pAMY1。pAMY1 对大肠杆菌的生长无明显影响, 但其自身质粒合成效率得到提高, 因此淀粉酶表达量明显增加。将纤维素酶基因克隆到 pAMY1 也能表达和分泌纤维素酶, 表明地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因的启动子、信号肽可以在大肠杆菌 Top10 中有效分泌表达异源基因。本研究构建的表达质粒 pAMY1 基因组较小, 能在大肠杆菌克隆菌株 Top10 中分泌表达重组蛋白, 这样就不需要将基因从克隆载体转移到表达载体, 简化了操作过程。另外, 由于出发载体 pHY300PLK 为大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒, 可以尝试将改造后的 pAMY1 转化枯草芽孢杆菌表达。

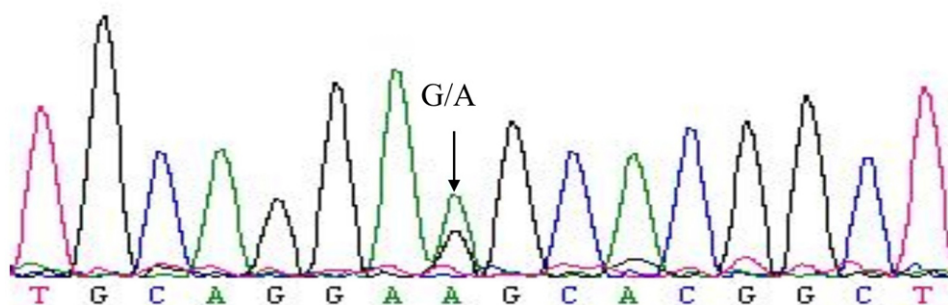
参考文献:

- [1] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*[J]. Postepy Biochem, 2006, 52(4): 448-456.
- [2] Dong X, Tang B, Li J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (Glycine max) seed ferritin complex in *Escherichia coli*[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(2): 299-307.
- [3] Izard J W, Doughty M B, Kendall D A. Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function[J]. Biochemistry, 1995, 34(31): 9904.

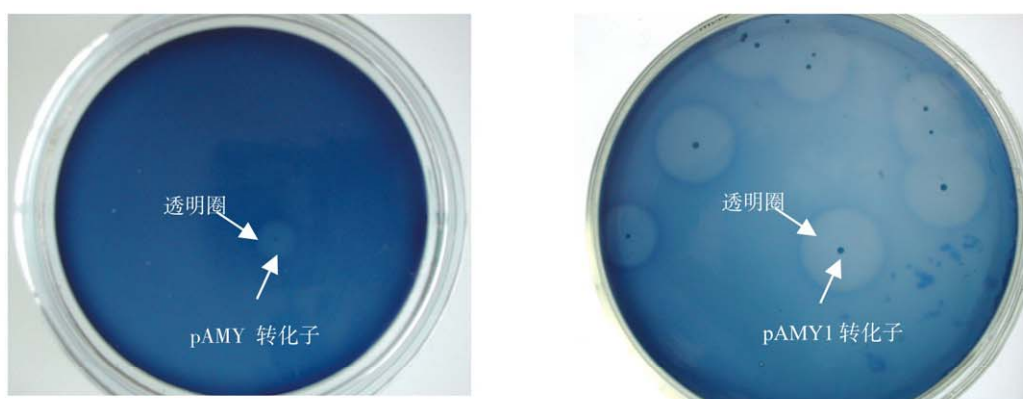
- [4] 牛丹丹, 徐敏, 马骏双, 等. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的克隆及其启动子功能鉴定[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 576–580.
- [5] 蔡恒, 陈忠军, 万红贵, 等. 地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶信号肽的序列分析及其在大肠杆菌中的分泌特性[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 106–109.
- [6] 刘成君, 黄庆, 赵莲, 等. 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒载体pSUGV4的构建[J]. 四川大学学报, 2001, 38(2): 243–246.
- [7] 牛丹丹. 高温酸性 α -淀粉酶基因的定向突变及在地衣芽孢杆菌中的表达[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [8] Chadd H E, Chamow S M. Therapeutic antibody expression technology [J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 188–194.
- [9] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems [J]. Appl Microbiol Bio-technol, 2006, 72(2): 211–222.
- [10] 江均平, 蔡丽君, 龚霄. 热稳定高比活纤维素酶在毕赤酵母中的表达研究[J]. 工业微生物, 2010, 40(5): 27–31.
- [11] 乔建军, 杜连祥. 一种快速有效的枯草芽孢杆菌染色体的提取方法[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 38–40.
- [12] 萨姆布鲁 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 余炎林. 简便、快速、高效的大肠杆菌转化法[J]. 第一军医大学学报, 1993, 14(2): 140–141.
- [14] GB/T2306—1997, 耐高温 α -淀粉酶制剂[S].
- [15] Miller G L, Blum R, Glennon W E, et al. Measurement of carboxymethylcellulase activity[J]. Anal Biochem, 1960(2): 127–132.
- [16] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature (London), 1970, 227: 680–685.
- [17] 张礼星. 耐高温 α -淀粉酶的研究概况[J]. 江苏食品与发酵, 1996(3): 29–31.
- [18] Lee You-Jung, Kim Bo-Kyung, Lee Bo-Hwa, et al. Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyolique-faciens* DL-3 utilizing rice hull[J]. Bioresouree Technology, 2008, 99(2): 378–386.
- [19] Yoshimoto T, Oyama H, Honda T, et al. Cloning and expression of subtilisin amylosacchariticus gene[J]. Biochem, 1988, 103: 1060.
- [20] Sumitomo N, Ozaki K, Kawai S, et al. Nucleotide sequence of the gene for an alkaline engoglucanase from an alkalaphilic *Bacillus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56: 872–877.
- [21] Chen Chao-ying, Wang Yi-huei, Huang Chien-jui. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Bacillus circulans* *chiA* gene[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(6): 451–454.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维



第60页 图2 PGR基因exon1序列分析
Fig.2 on page 60 Sequence analysis of exon1 of PGR gene



第55页 图3 表达淀粉酶的*E. coli* pAMY、*E. coli* pAMY1转化子
Fig.3 on page 55 Transformants *E. coli* pAMY and *E. coli* pAMY1 expressing α -amylase



第55页 图4 表达纤维素酶的*E. coli* pCEL转化子
Fig.4 on page 55 Transformants *E. coli* pCEL expressing cellulase