

张婷婷,马 磊. 蜡样芽孢杆菌启动子片段克隆及转录活性分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):25-27.

蜡样芽孢杆菌启动子片段克隆及转录活性分析

张婷婷,马 磊

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832000)

摘要:为研究蜡样芽孢杆菌基因的转录调控特征,通过鸟枪法和蓝白斑筛选,获得 57 个蜡样芽孢杆菌启动子片段,并以 β -半乳糖苷酶为报告基因,比较了这些启动子片段在大肠埃希菌中的转录活性。对转录活性较高的 4 个启动子克隆片断进行测序、序列比对、特征分析,发现这 4 个克隆序列具有启动子元件、核糖体结合序列特征,其中 2 个克隆序列在枯草芽孢杆菌也表现出活性,表明兼有蜡样芽孢杆菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌 RNA 聚合酶 σ 因子序列识别特征。

关键词:启动子;随机克隆;蜡样芽孢杆菌;枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0025-03

蜡样芽孢杆菌属兼性厌氧微生物,可产生毒素引发呕吐、腹泻等肠胃疾病,严重威胁食品业^[1]和饲养业。然而,蜡样芽孢杆菌也可分泌抗菌物质,抑制有害微生物生长,降解土壤中的营养成分,改良生态环境,其产生的细菌蛋白酶也可被用于麻脱胶、明胶液化、牛奶脓化、还原硝酸盐、水解淀粉等用途。虽然蜡样芽孢杆菌典型菌株(ATCC14579)基因组已完成测序^[2],但目前对蜡样芽孢杆菌基因表达调控系统的研究较少,其内在丰富的遗传资源有待开发。本研究利用蜡样芽孢杆菌(ATCC14579)基因组文库资源分离、筛选了多个蜡样芽孢杆菌启动子序列,分析了其在大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌中的转录活性及序列特征,旨在为构建高效表达系统奠定基础,也为多宿主比较研究提供途径。

1 材料与与方法

1.1 材料

菌株 *Bacillus cereus* ATCC14579、*B. subtilis* DB104、*Escherichia coli* DH5 α 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC);质粒 pE(来自 pUC18,携带 *E. coli* 质粒复制区起始,*E. coli* rep)、

pGDV1(携带 *B. subtilis* 质粒复制区起始,*B. subtilis* rep)、pDL(携带 β -半乳糖苷酶基因,*bgaB*)为石河子大学生命科学学院实验室保存;质粒 pEB(*E. coli* - *B. subtilis* 穿梭载体)、pEB-*bgaB* 为本研究构建。限制性核酸内切酶、碱性磷酸酶、T₄ DNA 连接酶购自 Promage 公司,Taq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒提取、DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司。引物见表 1。

1.2 方法

1.2.1 启动子探测载体的构建 质粒 pGDV1 携带 1 段枯草杆菌质粒复制起始区(*B. subtilis* rep),通过 PCR 技术得到该序列(5'端设置 *Bgl* II 位点,3'端设置 *Sac* I 位点)。在质粒 pE 基础上,在 *Bgl* II、*Sac* I 之间插入枯草杆菌质粒复制起始区(*B. subtilis* rep),构建大肠埃希菌-枯草杆菌穿梭载体 pEB,酶切鉴定。

质粒 pDL 携带 β -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)^[3],通过 PCR 技术得到该序列(5'端设置 *EcoR* I 位点,3'端设置 *Sac* I 位点)。设计 *bgaB* 上游引物时,引物 3' 紧邻起始密码子(ATG),扩增后的*bgaB*基因片段不含原启动序列和核糖体

表 1 引物

| PCR 项目 | 名称 | 序列 | 限制性内切酶位点 |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|
| <i>B. subtilis</i> rep | <i>B. subtilis</i> rep-up | TTGAGCTCTAGCACTTTGCCACT | <i>Bgl</i> II |
| | <i>B. subtilis</i> rep-down | GGAGATCTCTTTTCTATCCCAATTTTC | <i>Sac</i> I |
| <i>bgaB</i> | <i>bgaB</i> -up | GGGGGAATTCATGAATGTGTTATCCTC | <i>EcoR</i> I |
| | <i>bgaB</i> -down | CAGTCGACGCATATTATGTTGCCAA | <i>Sal</i> I |
| 测序 | rep 方向测序引物 | ATCAACTTAGCATCTTCATA | |
| | <i>bga</i> 方向测序引物 | TATACCGGCTTGATGGGATT | |

结合序列。在质粒 pEB 上的 *EcoR* I 和 *Sal* I 之间插入该序列,获得了启动子探测载体 pEB-*bgaB*(图 1)。

1.2.2 启动子片段随机克隆、筛选、测序 蜡样芽孢杆菌(ATCC14579)基因组^[2]分别经 *Sau*3A I 部分酶切为 100~2 000 bp 的片段,通过 T₄ 连接酶将这些随机片段与经 *Bam*H I 酶切和碱性磷酸酶处理后的 pEB-*bgaB* 连接,电转入 *E. coli* DH5 α ,获得 pC(s)质粒系列(图 1)。

pC(s)连接物电转入 *E. coli* DH5 α 后,将感受态细胞涂布在含 X-gal 的 LB 平板上,挑选 18 h 内出现的明显蓝色菌

收稿日期:2013-11-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:31272416);石河子大学高层次人才科研启动专项(编号:RCZX201137);石河子大学优秀青年项目(编号:2012ZRKXYQ13)。

作者简介:张婷婷(1984—),女,新疆石河子人,硕士,讲师,主要从事微生物生态研究。E-mail:120978935@qq.com。

通信作者:马 磊,博士,副教授,主要从事生物信息学与分子遗传研究。E-mail:mlei@shzu.edu.cn。

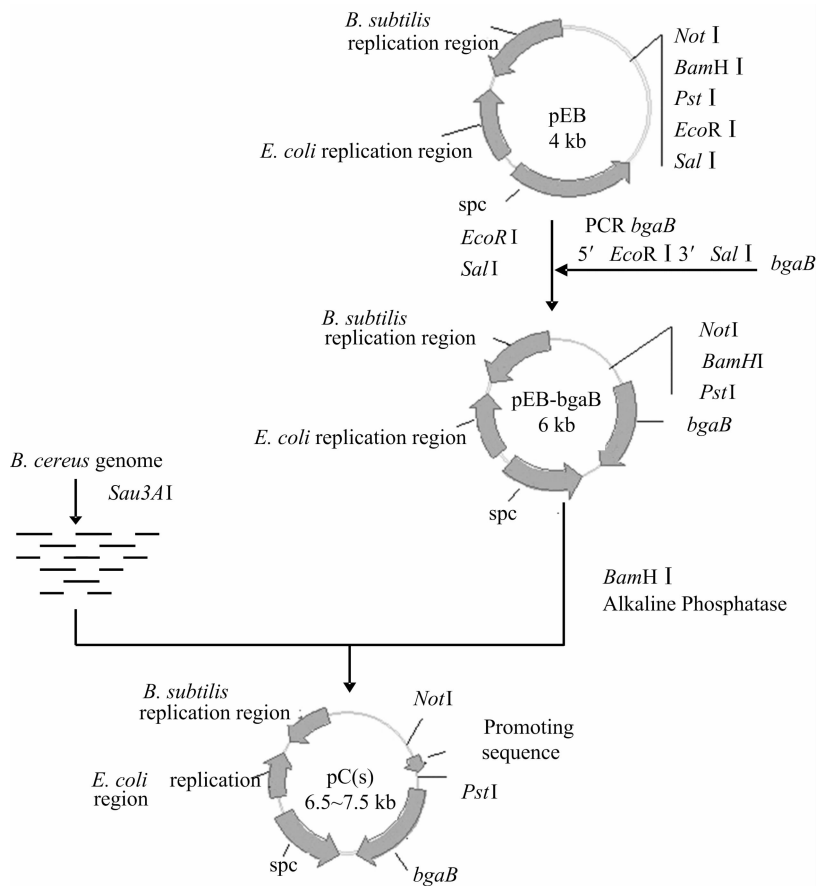


图1 载体构建及启动子随机克隆

落,提取质粒酶切及测序鉴定(图1)。

1.2.3 β -半乳糖苷酶活测定方法和定义^[4] 将一定体积菌液离心收集菌体,重悬于 700 μ L Z-Buffer (0.06 mol/L Na_2HPO_4 , 0.04 mol/L NaH_2PO_4 , 0.01 mol/L KCl, 0.001 mol/L MgSO_4 , 0.05 mol/L β -巯基乙醇, pH 值 7.0), 加入 10% Triton X 100 溶液 10 μ L 和 10 g/L 溶菌酶 10 μ L, 静置 30 min 后加入 4 g/L 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 200 μ L, 混匀后置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 加入 1 mol/L Na_2CO_3 500 μ L 终止反应, 离心, 取上清并在 420 nm 处测量其吸光度 ($D_{420\text{ nm}}$)。采用下式计算酶活:

$$U = \frac{D_{420\text{ nm}} \times 1\,000}{D_{595\text{ nm}} \times 15 \times V}$$

式中: U 为酶活计数单位 (Miller); $D_{595\text{ nm}}$ 为测定前菌液吸光度; V 为所用菌液体积。

挑单菌落分别接种于含 1%、5% 葡萄糖和空白对照液体的 LB 培养基中, 36 h 摇瓶后取样, 检测 β -半乳糖苷酶活。

2 结果与分析

在涂布 X-gal 的 LB 板上挑选 18 h 内出现的明显蓝斑, 获得 57 个能够表达 β -半乳糖苷酶的 pC(s) 克隆系列。克隆片段经临近的限制性内切酶 (Pst I、 Not I) 酶切后, 表现为 100 ~ 1 500 bp 的条带 (图 2)。

应用较便捷、灵敏、热稳定的 β -半乳糖苷酶作为启动子检测报告蛋白, 测定上述 57 个启动序列的转录和表达活性。从中挑选在大肠埃希菌中酶活大于 500 U 的 4 个克隆 (C1、

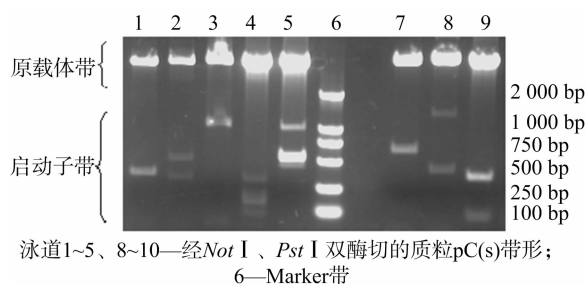


图2 克隆片段酶切图

C2、C4、C5) 重复测定酶活。其中 *E. coli* DH5 α (pC5) 活力最高, 为 1 522 U; *E. coli* DH5 α (pC1)、*E. coli* DH5 α (pC4) 次之, 分别为 1 229、1 136 U; *E. coli* DH5 α (pC2) 最低, 为 780 U。它们被转入枯草芽孢杆菌后, 只有 *B. subtilis* DB104 (pC1)、*B. subtilis* DB104 (pC4) 表现酶活, 分别为 169、1 370 U。

提取 *E. coli* DH5 α (pC1)、*E. coli* DH5 α (pC2)、*E. coli* DH5 α (pC4)、*E. coli* DH5 α (pC5)、空白对照 *E. coli* DH5 α (pEB-bgaB) 的胞内总蛋白, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 70 ku 左右 5 种菌株有 1 条清晰的带纹, 而空白对照的总蛋白在此处没有明显带纹, 该条带大小与 BgaB 大小接近 (图 3)。

除了 *B. subtilis* DB104 (pC1) 外, 葡萄糖对上述克隆的 β -半乳糖苷酶酶活均有明显抑制作用, 对 *E. coli* DH5 α (pC4) 的抑制率高达 78%, 对 *E. coli* DH5 α (pC1)、*E. coli* DH5 α (pC2)、*E. coli* DH5 α (pC5)、*B. subtilis* DB104 (pC4) 的抑制率也在 40% 以上。同时 *E. coli* DH5 α (pC5)、*B. subtilis* DB104 (pC4) 还受葡萄糖剂量影响 (图 4)。

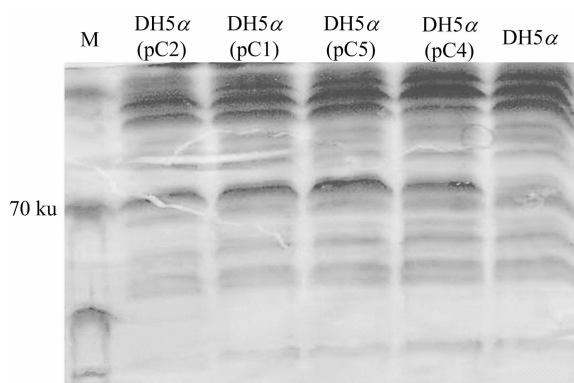


图3 BgaB SDS-PAGE 检测电泳图

序列分析发现,克隆获得的启动子与原核典型启动子具有同源性,存在与 16S rRNA 3'端互补的相似区域^[5](图 5)。C4 的 -35 区可能为 ATGACA, -10 区可能为 AATAAT(图

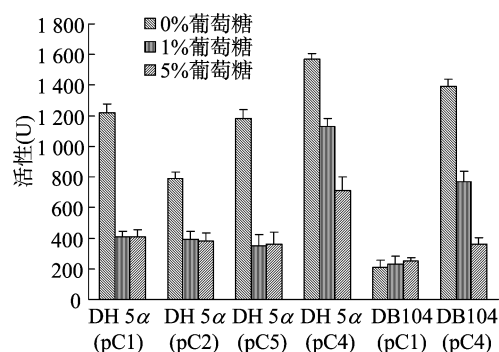


图4 启动功能测定和葡萄糖抑制作用

5),与枯草杆菌 σ^A (σ^{43}) 识别序列 -35 区、-10 区有较高同源性,因此其在枯草杆菌中可能由 σ^A 起始转录。虽然 C1、C2、C5 可能具有同源性较高的 -10 区,但 -35 区不太典型。

C1部分序列

AAAATAGAGG GCCGACATTA TAAACCTGCA CTAATAATGT AGAATTGTGA TGGCGGCTCT TTATTCATAT
TGATTTAAAA CTTATTTTCG AGAGGAGGTT AAGTAATGAG AGCGCCATA

C2部分序列

AAATAGAAAA GAGAATTCTT TGTTTTGTGT AAATGTTTTT TATAATATTT GACATGTTGA CAGATTATGA
AATGAAAGTG AGTGATCAAT GCCAAATTTC TTTGAGATT CAAGAACGCG GCGATCCCCC GGGCTGCAGG
AATTCATG

C4部分序列

AAAGGATACA TGACAAAGAT TCCTATAAAT TCTTCTCAAT AATTGAAAAT AAAATCAATC CAGATTATTA
TATTGTTATT GTAATTATAA TAGTAATTAC ATTTTATTGA AGGAGGATAC ATAGATGAAA

C5部分序列

TCCTCTACA TCTACATAAA GTGAACTAT AATTAGTTGG AGACTTCTCT CCTACTCCTT ATTAGTTGAA
CCATTCGAGC ATTTACAGGC TAACAGACTC CCTATTTACT TCTCCTAAAT CTTGAGGTTT TAGTCTTATC
GCCTACAAAT GGCAGGATAG TGCTGAACTC TAACTTTTGT ATTGTACCAC AATTCTCTCA TTAAGCAGTA
CTTCACTCTA TTTTCTTTT AAGGGAAAAC ATGCTATTCT TTAGGCAGG AAATGTAGAA AATGAGGTCG
ATATATTATG CATTATGATG

图例 — -35 Singnal, -10 Singnal, —RBS, ATG 为下游基因起始密码子

图5 启动子序列

3 结论与讨论

本研究构建了以 β -半乳糖苷酶(*bgaB*)^[5]为报告基因,在大肠埃希菌、枯草杆菌中均能稳定复制的启动子探测载体(图 1)。该载体所携带的 *bgaB* 基因不含启动子和核糖体结合序列,且在其起始密码子(ATG)上游具有多个酶切位点(Not I、Bam H I、Pst I),有利于启动子序列的克隆操作。以往研究中启动子克隆载体多以抗生素和绿色荧光蛋白(GFP)为报告基因,但是利用抗生素作为启动子筛选和检测指标,会因宿主菌产生的耐药性引起假阳性,检测数据高于真实值;利用绿色荧光蛋白对设备的要求比较高。*bgaB* 对宿主细胞生长影响较小,可特异性分解 X-gal 生成蓝色菌落,便于筛选。

本研究应用启动子随机克隆、蓝白斑筛选、 β -半乳糖苷酶酶活检测,成功获得了 4 个在 *E. coli* 中具有较高转录、表达活性的蜡样芽孢杆菌启动子序列,而且其中 2 个还能在枯草杆菌中转录和表达,因此它们具有多宿主 RNA 聚合酶 σ 因子序列识别特征。

参考文献:

- [1] Monika E S, Martina F, Siegfried S, et al. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004, 48(7): 479-487.
- [2] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*[J]. *Nature*, 2003, 423(6935): 87-91.
- [3] Yuan G, Wong S L. Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(19): 5427-5433.
- [4] Cutting S, Vander H. Genetic analysis, in C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *molecular biological methods for Bacillus*[M]. Chichester: John Wiley, 1990: 24-27.
- [5] Hirata H, Fukazawa T, Negoro S, et al. Structure of a beta-galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 166(3): 722-727.